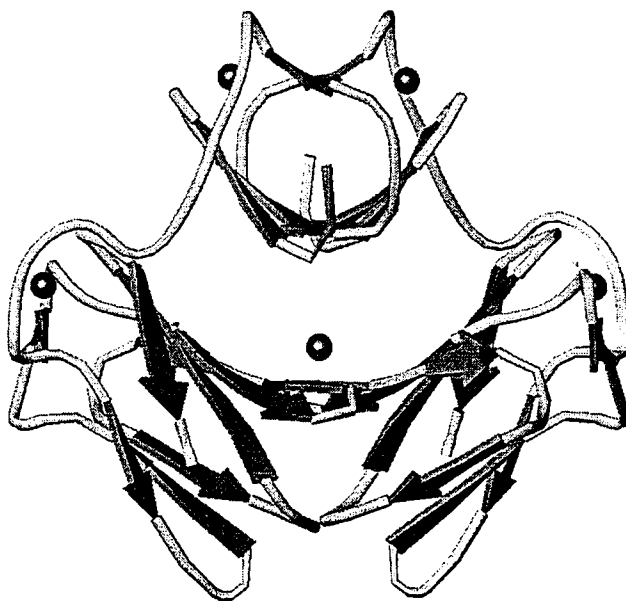




UNIVERSIDADE DE ÉVORA

DETERMINAÇÃO E ANÁLISE DA ESTRUTURA DA DESULFOFERRODOXINA

ISOLADA DE *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774



Ana Maria de Jesus Bispo Varela Coelho
(Licenciada)

Tese de doutoramento para obtenção do grau de doutor em Química (especialidade
Bioquímica)

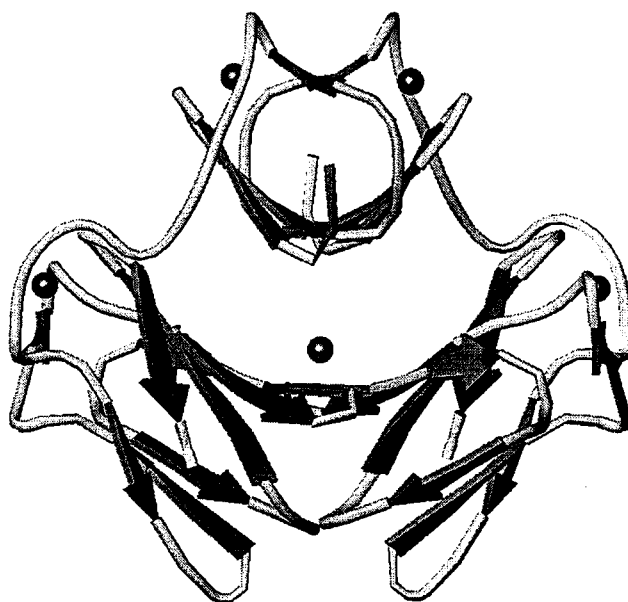
Março 1998



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

DETERMINAÇÃO E ANÁLISE DA ESTRUTURA DA DESULFOFERRODOXINA

ISOLADA DE *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774

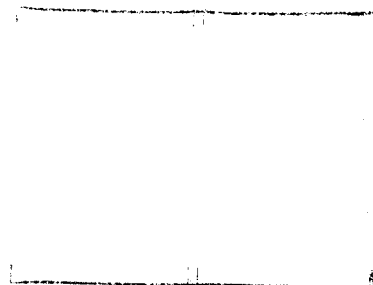


90 573

Ana Maria de Jesus Bispo Varela Coelho
(Licenciada)

Tese de doutoramento para obtenção do grau de doutor em Química (especialidade
Bioquímica)

Março 1998



ERRATA

Página	Linha	Onde se lê	Deve ler-se
X	18	diffraction data was also collected	diffraction data were also collected
2	6	Esta reacção química tem por outro lado	A reacção de redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} tem por outro lado
2	16	A utilização do oxigénio foi verificada em algumas espécies do género <i>Desulfovibrio</i>	A utilização do oxigénio, nomeadamente a sua redução, foi verificada em algumas espécies do género <i>Desulfovibrio</i>
5	legenda	c) estrutura da rubreritrina isolada de <i>D.d.</i>	c) estrutura do monómero da rubreritrina isolada de <i>D.d.</i>
9	18	À esta última proteína	A esta última proteína
11	15	proteína isolada e caracterizada em <i>D.d.</i> [37].	proteína isolada e caracterizada em <i>D.d.</i> Norway 4 [37].
22	legenda	presença de ferricianeto de potássio	presença de hexacianoferrato de potássio
27	14	F_{hkl} caracterizada por amplitude, ângulo de fase (α_{hkl})	F_{hkl} caracterizada por amplitude e ângulo de fase (α_{hkl})
37	15	modelo molecular e a estrutura determinar	modelo molecular e a estrutura determinar
38	21	Bijvoet máximas, o ponto de inflexão	Bijvoet máximas. O ponto de inflexão
38	23	de modo a maximizar as diferenças dispersivas.	de modo a maximizar as diferenças dispersivas por comparação com os dados recolhidos ao comprimento de onda a que f' é mínimo.
45	17	partir do mapas de Patterson	partir de mapas de Patterson
58	21	denominado refinado positional	denominado refinamento posicional
59	18	um estado de energia mínimo	um estado de energia mínima
63	8	$F_{j+}^H(\mathbf{h})$	$F_j^H(\mathbf{h})$
67	15	comprimento de onda a que f' é máximo	comprimento de onda a que f'' é máximo

68	legenda	atribuída ao átomo de ferro III	atribuída a um terceiro átomo de ferro
69	Tabela II.A.10	<i>acrescentar nota:</i> C2 e N2 são os átomos constituintes do grupo cianeto que estabelece a ligação FeII-Fe _{CN} .	
75	Figura II.A.21	Substituir figura II.A.21 por figura II.A.21 junta.	
81	legenda	à solução na tabela 1.	à solução na tabela IIB.1.
85	20	sugerem, tal como na forma cristalina romboédrica	sugerem, para o monómero A, tal como na forma cristalina romboédrica
85	21	Esta foi efectuada e incluída no processo de refinamento.	O mesmo comportamento não é tão evidente para o monómero B. Os valores dos factores de vibração térmica são, no entanto, significativamente elevados para os átomos Sδ e Cε quando este resíduo é considerado como metionina nos dois monómeros. A mutação por uma leucina foi, por isso, incluída no modelo sujeito ao processo de refinamento.
87	legenda	SHELX-93 estão identificados	SHELX-97 estão identificados
88	Tabela IIB.6	Factor G total (estruturas com a mesma resolução nominal	Factor G total (para estruturas com a mesma resolução nominal G= - 0.5±0.3)
97	legenda	a) 3.0 σ e b) 2.5 σ	a) 3.0 σ (representado a verde) e -3.0 σ (representado a vermelho) e b) 2.5 σ (representado a verde) e -2.5 σ (representado a vermelho)
98	legenda	a) 3.0 σ e b) 2.5 σ	a) 3.0 σ (representado a verde) e -3.0 σ (representado a vermelho) e b) 2.5 σ (representado a verde) e -2.5 σ (representado a vermelho)
104	10	Os átomos de ferro encontram-se à superfície da molécula	Os átomos de ferro encontram-se próximo da superfície da molécula.

		acessíveis ao solvente.	
108	Figura	Substituir figura III.A.4B por figura III.A.4B junta.	
	III.A.4B		
110	legenda	Os átomos de ferro estão representados a magenta	Os átomos de ferro estão representados a magenta
111	6	tetraédrica distorcida	tetraédrica distorcida
115	2	quatro fitas	três fitas
119	8/9	entre o átomo de ferro e o átomo mais próximo de cada resíduo	entre o átomo de ferro e o átomo de cada resíduo mais próximo deste
129	legenda	Acessibilidade para os vários resíduos	Acessibilidade relativa média para os vários resíduos
130	20	significativo.	significativo. Destes quatro resíduos apenas a Tyr88 é conservada nas sequências primárias da DFX isolada de <i>D.v.</i> e de <i>D.d.</i> .
132	legenda	<i>Substituir por: Figura III.A.14.</i> Empacotamento cristalino das moléculas de DFX na forma cristalina romboédrica, com representação em A) do plano <i>ab</i> e em B) do plano <i>ac</i> . Estão representados alguns elementos de simetria do grupo espacial R32. Em A) os eixos ternários de rotação existentes nos canais de solvente e normais a esta projecção estão representados pelo símbolo ▲, enquanto que o eixo binário de rotação contido no plano da projecção está representado pelo símbolo ↔. O eixo ternário de parafuso contido no plano da projecção foi representado, em B) , pelo símbolo ◆—◆. Os dois monómeros pertencentes a uma mesma molécula, relacionados por um eixo binário, estão representados com a mesma cor. A volta 39-47 está assinalada com um círculo numa única molécula.	
135	legenda	<i>Substituir por: Figura III.B.1.</i> Empacotamento cristalino das moléculas de DFX na forma cristalina monoclinica, com representação em A) do plano <i>ab</i> e em B) do plano <i>ac</i> . Estão representados alguns elementos de simetria do grupo espacial C2. Em A) , o eixo binário de rotação contido nesta projecção está representado pelo símbolo ↔, enquanto que os eixos binários de parafuso contidos no plano da projecção estão representados pelo símbolo ↙—↘. Cada molécula está representada com cor diferente. A volta 39-47 está assinalada com um círculo numa única molécula.	
140	4	observado na DFXr.	observado na DFXr (5.8 Å).
141	7	parâmetros geométricos	parâmetros geométricos

- 144 4 apresentados na tabela 4 apresentados na tabela IIIB.4
entre o átomo de ferro e o átomo entre o átomo de ferro e o átomo
mais próximo de cada resíduo de cada resíduo mais próximo
deste
- 148 Substituir página 148 por página 148 junta.
- 149 19 o oxigénio carbonílico da Ser87A o oxigénio carbonílico da Ser87B
- 151 Tabela Substituir tabela IIIB.10 por tabela IIIB.10 junta. As correcções
IIIB.10 introduzidas estão assinaladas utilizando fundo escuro.

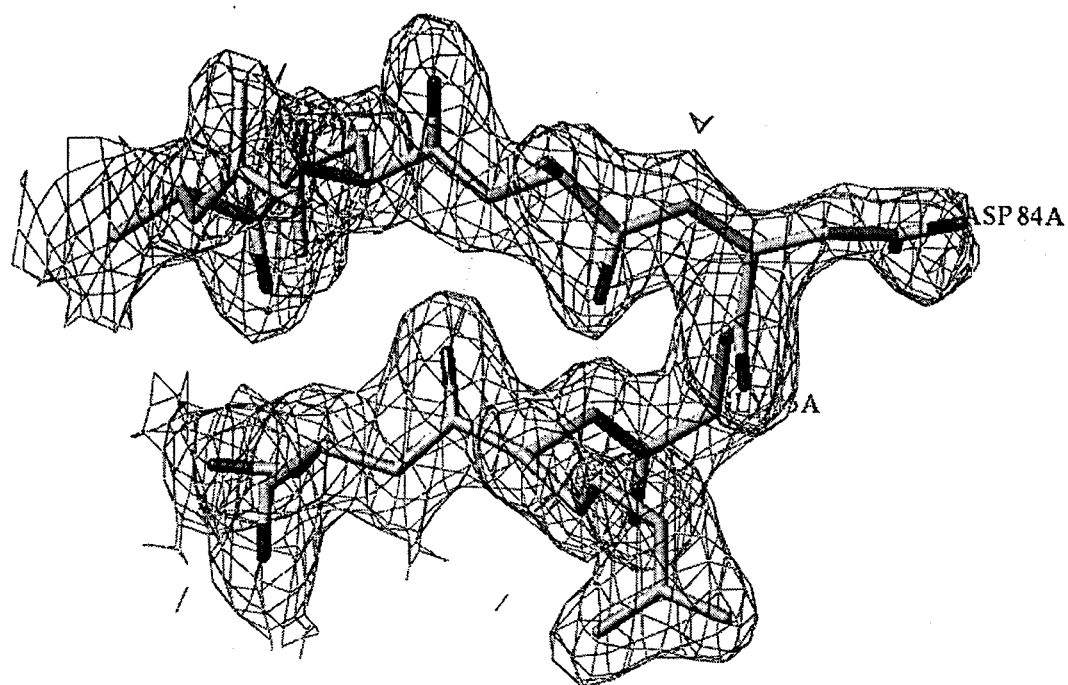


Figura IIA.21. Representação do β -hairpin loop 2:2 do tipo I' em que estão envolvidos os resíduos Asp84 e Gly85. É possível visualizar as duas pontes de hidrogénio estabelecidas pelos resíduos terminais do loop. O mapa de densidade electrónica $2|F_o|-|F_c|$ está representado a 1.0σ .

1 ANEGDVYK**C**ELCGQVVKVLEEGGGTLV**C**CGEDMVKQ

 2 PKHLEVYK**C**THCGNIVEVLHGGGAELV**C**CGEPM-KHMVEGST

 β2a β2b β1

2 DGAMEKHVPVIEKVDGGYLIKVGSVPHPMEEKHW

 β4a β4b

2 IEWIELLDGRSYTKFLKPGDAPEAFFAIDASKVTAREYCNLHGHWKAEN

 β3c β3d β4c β3b β3a

Figura III.A.4B. Alinhamento das seqüências de aminoácidos e identificação da estrutura secundária para a DX (1) e DFX (2). Os resíduos que coordenam os átomos de ferro estão representados a cheio.

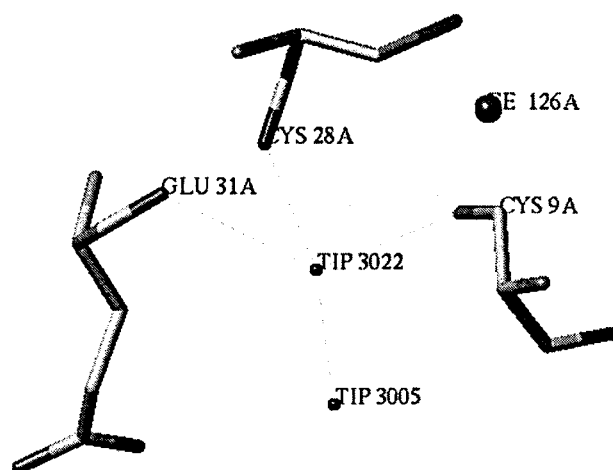


Figura III.B.5. Moléculas de água conservadas na proximidade do centro I na DFX. As moléculas de água e o átomo de ferro I estão representados por esferas, sendo a de maiores dimensões para o átomo de ferro.

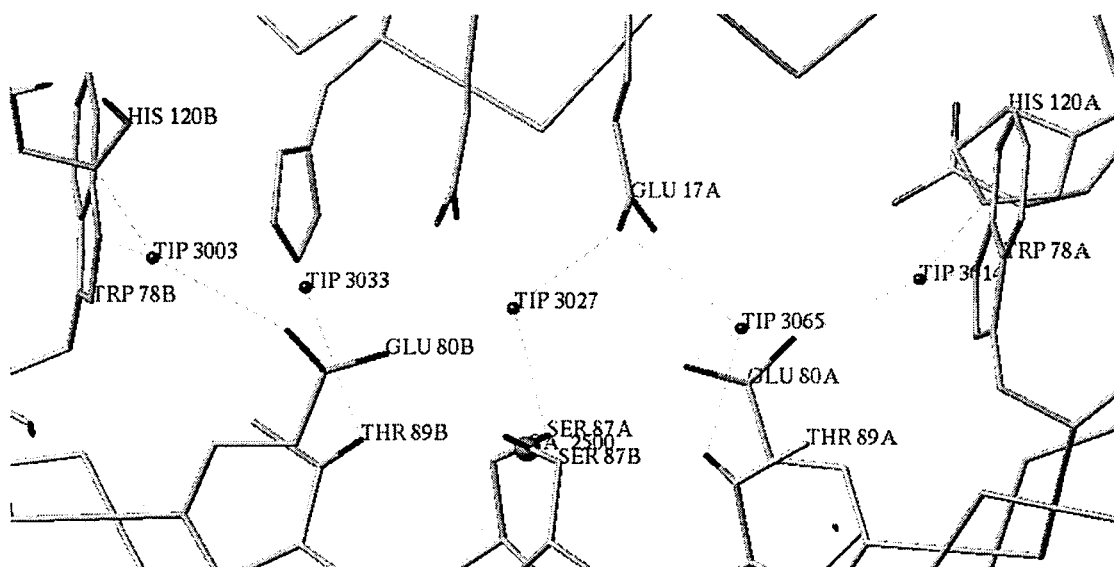


Figura III.B.6. Zona interdomínios onde estão representadas as cadeias laterais dos resíduos polares e aromáticos e as moléculas de água aí incluídas. As linhas a tracejada representam as pontes de hidrogênio estabelecidas entre os vários átomos representados. As moléculas de água e o íon cálcio estão representados por esferas, sendo a de maiores dimensões para o íon cálcio.

Tabela IIIB.10. Comprimentos e ângulos de ligação envolvendo o íon cálcio.

Ligandos		Comprimento de ligação Ca-X (Å)
Ser87A O γ		2.9
Ser87A O		2.9
Ser87B O γ		2.8
Ser87B O		2.9
Thr89B O γ 1		3.1
H ₂ O3027		2.8

X	Y	Ângulo X-Ca-Y (°)
Ser87A O γ	H ₂ O3027	69
Ser87A O γ	Ser87A O	61
H ₂ O3027	Ser87B O γ	102
Ser87A O	Ser87B O	75
Ser87B O γ	Ser87B O	64
Thr89B O γ 1	Ser87A O	80
Thr89B O γ 1	Ser87A O γ	98
Thr89B O γ 1	Ser87B O	107
Thr89B O γ 1	H ₂ O3027	82
Thr89B O γ 1	Ser87B O γ	81

Ao Miguel e ao João
pelo tempo de dedicação
que a execução deste trabalho lhes roubou

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado no Instituto de Tecnologia Química e Biológica; Universidade Nova de Lisboa; sob a orientação da Professora Doutora Maria Arménia Carrondo e a co-orientação do Doutor Pedro Matias. Por isso, os primeiros agradecimentos são para ambos.

À Professora Doutora Maria Arménia Carrondo que me integrou no seu grupo de trabalho, me cativou para a determinação estrutural por cristalografia de raios-X permitindo-me uma ampla formação nesta área científica e por ter contribuído com a sua amizade e o seu convívio para a minha formação pessoal.

Ao Doutor Pedro Matias pela disponibilidade na orientação deste trabalho e pelas substituições forçadas em deslocações para recolha de dados de difracção utilizando radiação de sincrotrão. Obrigada pelas trocas de impressões após um “puxa a cadeira e senta-te” que sempre se demonstraram bastante proveitosas.

Ao Doutor Carlos Frazão (ITQB, UNL) e ao Doutor Vilmos Fülöp (LMB, Universidade de Oxford) quero agradecer os ensinamentos, o entusiasmo no trabalho e a amizade.

Ao Professor Doutor Jean Le Gall por fornecer os extractos celulares utilizados na purificação da proteína caracterizada neste trabalho.

À Professora Doutora Isabel Moura e ao Doutor Pedro Tavares por fornecerem as amostras de proteína para os ensaios de cristalização, pela divulgação da estrutura

primária da desulfoferrodoxina antes da sua publicação e pelas trocas de impressões sobre os seus estudos bioquímicos e espectrocópicos.

Ao Doutor Larry Sieker, que acompanhou a fase inicial dos ensaios de cristalização da desulfoferrodoxina, pela introdução às artes e às técnicas da cristalização de proteínas.

Aos Doutores Andrew Thompson e Ana Gonzalez (ESRF, Grenoble) e Pierre Rizkallah (Daresbury, Manchester) pelo apoio técnico dispensado durante as sessões de recolha de dados de difracção utilizando radiação de sincrotrão.

Ao Doutor Cláudio Soares pela introdução aos cálculos de transferência electrónica em proteínas apresentados neste trabalho.

À Doutora Elspeth Garman (LMB, Universidade de Oxford) e à Doutora Carol Robinson (Departamento de Bioquímica, Universidade de Oxford), respectivamente, pelas ensaios de PIXE e MS efectuados em amostras de desulfoferrodoxina.

Ao Doutor Eric de la Fortelle pelo apoio no cálculo e na interpretação dos mapas residuais utilizando o programa SHARP.

A todos colegas do Grupo de Cristalografia de Proteínas do ITQB e aos “Teóricos” pela constante amizade e apoio.

À Universidade de Évora na pessoa do Presidente do Conselho do Departamento de Química, Prof. Júlio Cruz Morais, que proporcionou sempre que possível as condições para a realização deste trabalho. Aos colegas do Departamento de Química da Universidade de Évora que têm compartilhado comigo o trabalho docente e frequentemente se dispuseram a assumir algumas das tarefas da minha responsabilidade de modo a proporcionar-me maior disponibilidade para a realização deste trabalho. E a todos os outros que demonstraram interesse e apoio durante a realização deste trabalho, em particular aos meus parceiros de gabinete.

Ao ITQB, na pessoa do Presidente da Comissão Instaladora, Professor António Xavier, agradeço a oportunidade de trabalhar neste excelente Instituto, usufruindo das óptimas condições de trabalho aí criadas e do convívio constante com a actividade científica de inegável qualidade aí desenvolvida.

Às várias instituições a seguir mencionadas agradeço o apoio financeiro que me facultaram para a frequência de acções de formação, nomeadamente: a Universidade de Évora, o Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB), a Fundação Calouste Gulbenkian, a Comissão das Comunidades Europeias, a Organização Tratado Atlântico Norte (OTAN), a European Science Foundation (ESF), a Federation of European Biochemical Societies (FEBS) e a Junta Nacional de Investigação Científica (JNICT).

Resumo

Da grande variedade de metaloproteínas que tem sido isolada de bactérias redutoras de sulfato várias têm já as suas estruturas tridimensionais conhecidas, nalguns casos tendo sido encontrados centros metálicos com novas características, noutros combinações invulgares de centros metálicos numa mesma molécula de proteína. O esclarecimento da relação estrutura-função para uma determinada proteína e, em particular, o estabelecimento do envolvimento do seu centro metálico na actividade biológica contribuem para a elucidação do metabolismo particular das bactérias redutoras de sulfato. Adicionalmente é possível prever da actividade funcional e do mecanismo de actuação de proteínas com características estruturais semelhantes.

A cristalografia de raios-X por monocristal é utilizada na determinação de estruturas moleculares, em particular de proteínas, com resolução e rigor suficientes para permitir uma análise detalhada da estrutura molecular encontrada. Por isso, é amplamente utilizada em estudos deste tipo.

Esta dissertação é iniciada com uma introdução onde se expõem os conhecimentos já adquiridos e o interesse subjacente aos estudos do metabolismo de bactérias redutoras de sulfato, nomeadamente, no que se refere ao envolvimento de certas metaloproteínas, proteínas não-hémicas com centros mononucleares de ferro, e em

particular a desulfoferrodoxina. Esta proteína, cuja actividade biológica não foi ainda determinada, foi isolada de *Desulfovibrio vulgaris* e de *Desulfovibrio desulfuricans*. Estudos espectroscópicos efectuados antes desta determinação estrutural sugeriram a existência de dois centros mononucleares de ferro diferentes por monómero, sendo um deles do tipo desulforedoxina e o segundo coordenado na sua maioria por átomos de oxigénio e/ou azoto. A comparação estrutural do centro de ferro II desta proteína com outros centros do mesmo tipo motivou a apresentação de um breve resumo sobre as características estruturais de proteínas com centros mononucleares de ferro e multinucleares coordenados por átomos de azoto e enxofre.

Na Parte II (Parte experimental) são descritos os procedimentos experimentais utilizados e os resultados obtidos durante a execução deste trabalho. A descrição de cada etapa do trabalho efectuado é, sempre que se julgou necessário, antecedida pela apresentação de um breve resumo dos aspectos teóricos aí envolvidos. Numa primeira fase é descrita a determinação da estrutura da desulfoferrodoxina utilizando dados de difracção de raios-X obtidos a partir de cristais romboédricos crescidos na presença de um agente oxidante e fases determinadas a 2.8 Å pelo método de dispersão anómala a múltiplos comprimentos de onda, utilizando os átomos de ferro presentes na proteína nativa como dispersores anómalos. O modelo construído a partir do mapa de densidade electrónica calculado foi refinado a 1.9 Å. As coordenadas do modelo refinado são utilizadas para a determinação da estrutura da desulfoferrodoxina em cristais monoclinicos crescidos na presença do mesmo agente oxidante, recorrendo-se ao método de substituição molecular. É ainda efectuada a comparação de mapas de densidade electrónica calculados utilizando dados de difracção recolhidos para cristais obtidos na presença de um agente oxidante e de um agente redutor, com o objectivo de

conhecer diferenças estruturais para dois estado de oxidação da desulfoferrodoxina, o oxidado e o semi-reduzido. Algumas implicações resultantes da análise da estrutura refinada da desulfoferrodoxina foram verificadas recorrendo às técnicas de espectrometria de massa e de emissão de protões induzida por raios-X.

A terceira parte do trabalho (Discussão) é iniciada com a descrição e análise da estrutura refinada para cristais romboédricos de desulfoferrodoxina. Esta pode ser descrita como um homodímero constituído por dois domínios, cada um contendo dois centros não-hémicos mononucleares de ferro equivalentes por simetria cristalográfica. O domínio I, com dois centros de ferro do tipo-rubredoxina com geometria tetraédrica distorcida, é semelhante à estrutura da desulfiredoxina. Os centros de ferro do domínio II têm uma coordenação em pirâmide quadrangular por quatro átomos de azoto de resíduos histidina que ocupam as posições equatoriais e um átomo de enxofre pertencente a um resíduo cisteína na posição axial. A sexta posição de coordenação é parcialmente ocupada por um ião hexacianoferrato. A elevada semelhança estrutural entre o domínio I da desulfoferrodoxina e a molécula de desulfiredoxina e a forte interacção estabelecida entre monómeros devida à presença de três folhas β que se estendem ao longo do dímero, duas no domínio I e uma no domínio II, sugerem que a desulfoferrodoxina tem actividade funcional como dímero. A interpretação dos mapas de densidade electrónica e a natureza da vizinhança atómica são consistentes com a atribuição de um ião cálcio a um máximo de densidade electrónica existente na zona de interacção entre monómeros. O subsequente refinamento confirma esta interpretação. A presença do ião cálcio é indispensável para a obtenção de cristais, podendo contribuir para a estabilização do dímero. É sugerida uma ocupação de 30%

para um ião hexacianoferrato constituindo o átomo de azoto de um dos grupos cianeto a sexta posição de coordenação do centro II de ferro.

As coordenadas para a estrutura da desulfoferrodoxina na forma oxidada foram depositadas na base de dados Protein Data Bank (PDB) com o código de identificação 1DFX.

As estruturas refinadas da desulfoferrodoxina em ambas as formas cristalinas, monoclinica e romboédrica, são bastante semelhantes, sendo também sugerida para a forma monoclinica a presença de um ião cálcio na região de contacto dos dois monómeros e uma ocupação parcial da sexta posição de coordenação do centro II do monómero B por um átomo de azoto de um ião hexacianoferrato. A análise dos mapas de densidade electrónica obtidos com dados de difracção recolhidos para cristais de desulfoferrodoxina com o centro II nos dois estados de oxidação e o seu conteúdo em ferro determinado pelo método de emissão de protões induzida por raios-X reforçam a proposta de ocupação da sexta posição de coordenação por um ião hexacianoferrato.

Os resultados de uma análise comparativa de topologias entre as estruturas da desulfoferrodoxina e outras proteínas com estruturas conhecidas, mostraram que o domínio C-terminal do monómero da desulfoferrodoxina tem uma topologia do tipo da fibronectina III.

Os cálculos efectuados com o objectivo de determinar percursos de transferência electrónica preferenciais na molécula de desulfoferrodoxina mostraram a existência de idêntica facilidade de transferência electrónica entre os dois centros I de ferro, centros de ferro de um mesmo monómero e entre um dos centros de ferro e alguns dos resíduos da região interdomínios.

É ainda apresentada uma breve comparação estrutural entre outras proteínas não-hémicas com centros mononucleares de ferro isoladas de bactérias redutoras de sulfato e a desulfoferrodoxina.

Na parte quatro (Considerações finais e perspectivas futuras) é apresentada uma síntese das interpretações dos resultados obtidos relativamente à análise da estrutura da desulfoferrodoxina e sugeridos alguns estudos a serem realizados com o objectivo de confirmar algumas das propostas apresentadas.

Abstract

Several metalloproteins have been isolated from the sulphate-reducing bacteria. Among those of known tridimensional structure, some revealed new types of metal centres while others unusual combinations of centres. The understanding of the structure-function relationship of a protein, and in particular, the knowledge of the role of its metal centres in its biological activity allows the clarification of the unusual metabolism of the sulphate reducing-bacteria and the prediction of the functional activity and the reactional mechanism of proteins with structural similarities. To do this type of analysis molecular structures must be known with sufficient precision and detail. X-ray crystallography is still the most powerful technique used to solve tridimensional structures. If the crystals diffract to high resolution, than atomic detail can even be achieved.

In the introduction, a brief review of studies on the sulphate-reducing bacteria metabolism is presented, in regard to some metalloproteins, in this case on non-heme proteins with mononuclear iron centres and, in particular, on desulfoferrodoxin. This protein, with unknown biological activity, was isolated from *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio desulfuricans*. Spectroscopic studies suggested that each monomer contains two different mononuclear iron centres, a desulforedoxin-type centre and an

iron centre coordinated mainly by oxygen and/or nitrogen atoms. In this chapter a summary it is also presented of the structural characteristics of mononuclear non-heme iron centre proteins and of some proteins containing iron clusters coordinated by nitrogen and sulphur used for structural comparison with the desulfoferrodoxin iron centre II.

In part II (Experimental) the experimental procedures used and the results obtained during this work are described. Before the description of each part of the work performed some theoretical aspects directly related with it are presented. The structure determination of desulfoferrodoxin by MAD phasing to 2.8 Å resolution using diffraction data collected from rhombohedral crystals grown in the presence of an oxidizing agent is described. The iron atoms in the native protein were used as the anomalous scatterers. The model was built from an electron density map obtained after density modification and refined against data collected to 1.9 Å. The refined structure was used as a model in the determination of the monoclinic structure of desulfoferrodoxin by the molecular replacement method, using diffraction data collected for crystals grown in the presence of the same oxidizing agent. In order to determine structural differences between the oxidized and half-reduced states of desulfoferrodoxin, diffraction data was also collected from crystals grown in the presence of a reducing agent. Difference Fourier maps were calculated using these and the initial data measured from crystals grown in the presence of an oxidizing agent, and with phases obtained both by the MAD method and from the refined desulfoferrodoxin model. Some implications arisen from the structural analysis of the desulfoferrodoxin molecular model were confirmed using mass spectroscopy and proton induced X ray emission techniques.

The third part of this work (Discussion) begins with the description and analysis of the refined rhombohedral desulfoferrodoxin structure, which can be described in terms of two domains, each with two crystallographically equivalent non-heme mononuclear iron centres. Domain I is similar to desulforedoxin, with distorted rubredoxin-type centres, and domain II has iron centres with square pyramidal coordination to four nitrogens from histidines as the equatorial ligands and one sulphur from a cysteine as the axial ligand. Domain I in desulfoferrodoxin shows a remarkable structural fit with the desulforedoxin homodimer. Furthermore, three β -sheets extending from one monomer to another in desulfoferrodoxin, two in domain I and one in domain II, strongly support the assumption of desulfoferrodoxin as a functional dimer. A calcium ion, shown to be indispensable in the crystallisation process, was assumed at the dimer interface and appears to contribute to dimer stabilisation. A 30% occupancy by a ferricyanide ion in the sixth coordination position of centre II is suggested.

Desulfoferrodoxin coordinates were deposited on the PDB Data Bank with the accession code 1DFX.

The refined models for desulfoferrodoxin in both crystalline forms, monoclinic and rhombohedral, are very similar. For the monoclinic structure the presence of a calcium ion in the dimer interface and the partial occupancy of the sixth coordination position of centre II in monomer B by a ferricyanide ion is also observed. Both the comparison between the diffraction data collected for crystals with the centre II in the two oxidation states and the amount of iron present in desulfoferrodoxin crystals, as determined by the proton induced X ray emission technique, support the previous proposal.

The C-terminal domain in the monomer has a topology fold similar to that of fibronectin III, as was determined by comparative topology analysis.

The preferred electron transfer pathways determined for desulfoferrodoxin show that there is similar electron transfer probability between the two iron centres in domain I, between the iron centres in the same monomer and between one of the iron centres and some of the residues in the interdomain region.

This part concludes with a short structural comparison of several non-heme proteins with mononuclear iron centres isolated from the sulphate-reducing bacteria, including desulfoferrodoxin.

In the last part (Final remarks and future work) a synthesis of the results interpretation on the desulfoferrodoxin structure analysis is presented and some future work is outlined in order to confirm some of them.

Palavras-chave

Análise estrutural

Estrutura cristalina

Cristalografia de proteínas

Método de dispersão anômala a múltiplos comprimentos de onda

Bactérias redutoras de sulfato

Desulfovibrio

Metaloproteínas

Desulfoferrodoxina

Desulforedoxina

Rubredoxina

Centro de ferro não-hémico

Transferência electrónica

Keywords

Structure analysis

Crystal structure

Protein crystallography

Multianomalous dispersion method

Sulphate-reducing bacteria

Desulfovibrio

Metalloproteins

Desulfoferrodoxin

Desulforedoxin

Rubredoxin

Non-heme iron centre

Electron transfer

Abreviaturas

<i>D.</i>	<i>Desulfovibrio</i>
<i>D.d.</i>	<i>D. desulfuricans</i>
<i>D.g.</i>	<i>D. gigas</i>
<i>D.v.</i>	<i>D. vulgaris</i>
DFX	Desulfoferrodoxina
DFX _m	DFX em malha monoclínica
DFX _r	DFX em malha romboédrica
DX	Desulforedoxina
Fe I	Átomo de ferro constituinte do centro I da DFX
Fe II	Átomo de ferro constituinte do centro II da DFX
Fe _{CN}	Átomo de ferro constituinte do ião hexacianoferrato
HEPES	Ácido (N-[2-hidroxi-etil]piperazina-N'-[2-etanosulfónico])
MAD	Método de dispersão anómala a múltiplos comprimentos de onda
MES	Ácido (2-[N-morfolino]etanosulfónico)
MIR	Método de substituição isomórfica múltipla
MPD	2-metilpentano-2,4-diol
MS	Espectrometria de massa
NI	Neelaredoxina
PEG	Polietilenoglicol
PIXE	Emissão de protões induzida por raios-X
Tris	Trishidroximetilaminometano

Índice	
Agradecimentos	i
Resumo	iv
Abstract	ix
Palavras Chave	xiii
Keywords	xiv
Abreviaturas	xv
Índice	xvi
I INTRODUÇÃO	1
1.1. Bactérias redutoras de sulfato	1
1.2. Proteínas não hémicas com centros mononucleares de ferro isoladas de bactérias redutoras de sulfato do género <i>Desulfovibrio</i>	3
1.2.1. Desulforedoxina	6
1.2.2. Desulfoferrodoxina	8
2. Proteínas de outros organismos com centros mononucleares de ferro e com centros multinucleares de ferro coordenados por átomos de azoto e enxofre	11
II PARTE EXPERIMENTAL	14
A. DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA DA DESULFOFERRODOXINA ISOLADA DE <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 27774	14
1. Cristalização da desulfoferrodoxina isolada de <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 27774	16
1.1. Materiais e métodos	17

1.2. Resultados	19
2. Congelamento dos cristais de desulfoferrodoxina	24
2.1. Materiais e métodos	24
2.2. Resultados	26
3. Recolha dos dados de difracção e caracterização das diferentes formas cristalinas	26
3.1. Materiais e métodos	27
3.2. Resultados	31
4. Determinação das fases	34
4.1. Materiais e métodos	40
4.1.1. Método de substituição isomórfica múltipla	41
4.1.2. Método de substituição molecular	43
4.1.3. Método de dispersão anómala a múltiplos comprimentos de onda	43
4.2. Resultados	46
4.2.1. Método de substituição isomórfica múltipla	46
4.2.2. Método de substituição molecular	50
4.2.3. Método de dispersão anómala a múltiplos comprimentos de onda	50
5. Construção do modelo e refinamento da forma cristalina romboédrica	57
5.1. Materiais e métodos	60
5.1.1. Construção do modelo e refinamento	60
5.1.2. Cálculo de mapas residuais utilizando o formalismo de máxima verosimilhança	62
5.2. Resultados	64
5.2.1. Refinamento e modelação molecular	64

5.2.2. Interpretação de mapas residuais calculados utilizando o formalismo de máxima verosimilhança	67
5.2.3. Avaliação da qualidade do modelo final	71
B. DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA E REFINAMENTO DA FORMA CRISTALINA	
MONOCLÍNICA	77
1. Materiais e métodos	77
1.1. Determinação da estrutura através do método de substituição molecular	77
1.2. Refinamento e modelação molecular	78
2. Resultados	80
2.1. Determinação da estrutura através do método de substituição molecular	80
2.2. Refinamento e modelação molecular	84
2.3. Avaliação da qualidade do modelo final	88
C. COMPARAÇÃO DOS MAPAS DE DENSIDADE ELECTRÓNICA OBTIDOS PARA CRISTAIS NO ESTADO OXIDADO E NO ESTADO SEMI-REDUZIDO	95
1. Materiais e métodos	95
2. Resultados	96
D. OUTRAS DETERMINAÇÕES EFECTUADAS UTILIZANDO CRISTAIS DE DESULFOFERRODOXINA	99
1. Materiais e métodos	99
1.1. Determinação da massa molecular da desulfoferrodoxina	99
1.2. Determinação do conteúdo em ferro e em cálcio em cristais de desulfoferrodoxina	100
2. Resultados	101

2.1. Determinação da massa molecular da desulfoferrodoxina	101
2.2. Determinação do conteúdo em ferro e em cálcio em cristais de desulfoferrodoxina	101
III ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	103
A. DESCRIÇÃO E ANÁLISE DA ESTRUTURA REFINADA DA DESULFOFERRODOXINA ISOLADA DE <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 27774	103
1. Aspectos gerais da estrutura da desulfoferrodoxina	103
2. Estrutura secundária e terciária do monómero	106
3. Domínio I, tipo-DX	109
4. Domínio II	114
5. Interação entre subunidades e estrutura de solvente	120
6. Região interdomínios e distribuição de resíduos aromáticos	124
7. Acessibilidade relativa	129
8. Empacotamento cristalino	131
B. COMPARAÇÃO ENTRE AS ESTRUTURAS REFINADAS DA DESULFOFERRODOXINA A PARTIR DE DADOS DE DIFRAÇÃO OBTIDOS PARA CRISTAIS ROMBOÉDRICOS E MONOCLÍNICOS	134
1. Empacotamento cristalino	135
2. Comparação dos aspectos gerais da estrutura refinada da desulfoferrodoxina nos dois sistemas cristalinos	136
3. Centros de ferro e a sua vizinhança	138
3.1. Centro I de ferro	138
3.2. Centro II de ferro	141
4. Interação entre subunidades e estrutura de solvente	145

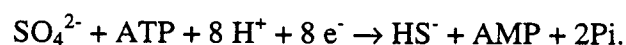
5. Ião cálcio presente na região interdomínios	149
C. PROTEÍNAS COM TOPOLOGIA SEMELHANTE À DA DESULFOFERRODOXINA	152
D. COMPARAÇÃO DOS MAPAS DE DENSIDADE ELECTRÓNICA OBTIDOS PARA CRISTAIS NO ESTADO OXIDADO E NO ESTADO SEMI-REDUZIDO	154
E. ALGUNS COMENTÁRIOS SOBRE OS RESULTADOS DE MS E PIXE	156
F. CAMINHOS PREFERENCIAIS DE TRANSFERÊNCIA ELECTRÓNICA NA DESULFOFERRODOXINA	158
1. Breve descrição dos modelos teóricos utilizados actualmente em estudos de transferência electrónica	158
2. Cálculos de transferência electrónica para a desulfoferrodoxina	160
G. ALGUMAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E BIOLÓGICAS DA DESULFOFERRODOXINA E DE OUTRAS PROTEÍNAS NÃO-HÉMICAS COM CENTROS MONONUCLEARES DE FERRO ISOLADAS DE BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO	166
IV CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	168
V APÊNDICE - Composição das soluções factoriais usadas no processo de cristalização	172
Bibliografia	174

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1.1. Bactérias redutoras de sulfato

Os procariotas redutores de sulfato constituem um grupo heterogéneo de microorganismos que inclui bactérias e archaeobactérias e que têm em comum a capacidade de utilizar o grupo sulfato como aceitador terminal de electrões [1]. O sulfato é reduzido a hidrogenossulfureto numa série de reacções em que o 5'-fosfossulfato de adenosina e o hidrogenossulfito são intermediários, sendo a reacção global traduzida pela seguinte equação



A redução do sulfato requiere energia proveniente da hidrólise do ATP a AMP, compensada pela criação de um gradiente protónico associado à fosforilação do ADP a ATP e/ou pela formação de ATP durante o processo de oxidação do substrato dador de electrões.

Além do hidrogénio molecular e do ferro metálico, vários compostos orgânicos podem ser usados como dadores de electrões neste processo de redução do sulfato,

nomeadamente, o formato, o lactato ou o piruvato e inclusivé alguns componentes do petróleo bruto [1, 2, 3, 4].

O metabolismo particular das bactérias redutoras de sulfato torna-as um agente importante em alguns processos ambientais e industriais. Provocam prejuízos importantes devido ao seu envolvimento em processos anaeróbicos de corrosão do ferro em que ocorre a oxidação do ferro metálico. Esta reacção química tem por outro lado, importância biogeoquímica na formação da siderite (carbonato ferroso), processo em que algumas espécies de bactérias redutoras de sulfato intervêm. Constituem ainda sistemas biológicos com potencial para serem utilizados na remoção de sulfato, componentes orgânicos [5, 6] e metais pesados de águas residuais [7] e na remoção de dióxido de enxofre de gases de combustão [1, 2, 3]. A presença de bactérias redutoras de sulfato no aparelho digestivo de vários mamíferos [8] justifica a realização de estudos para averiguar da sua importância fisiológica e da hipótese do seu envolvimento em estados patogénicos, como foi sugerido para a colite ulcerosa [9].

Além do sulfato, algumas bactérias redutoras de sulfato podem reduzir o nitrato ou o nitrito a amónia. A utilização do oxigénio foi verificada em algumas espécies do género *Desulfovibrio*, o que põe em causa a classificação destes organismos como anaeróbicos obrigatórios [10, 11, 12].

O esclarecimento do metabolismo deste tipo de microorganismos reveste-se de bastante interesse não só devido às potenciais aplicações já referidas, mas também devido, por um lado, ao seu carácter invulgar e por outro, à semelhança que certas proteínas, nomeadamente, certas metaloproteínas envolvidas em reacções redox apresentam com domínios de enzimas existentes em mamíferos [11]. No entanto, os avanços têm sido dificultados pela diversidade das vias metabólicas existente nesta variedade de microorganismos. Por exemplo o estabelecimento da actividade

fisiológica de várias metaloproteínas envolvidas em processos de transferência electrónica tem sido em parte dificultado pela falta de uniformidade com que estas estão distribuídas nas várias espécies de um dos géneros mais estudados, o género *Desulfovibrio* da família *Desulfovibrionaceae*. Adicionalmente, a sua localização celular é de difícil determinação, devido à destruição das estruturas celulares durante a execução de experiências de reconstituição em que são utilizados extractos livres de células [29].

1.2. Proteínas não-hémicas com centros mononucleares de ferro isoladas de bactérias redutoras de sulfato do género *Desulfovibrio*

Uma grande variedade de metaloproteínas envolvidas em processos redox têm sido isoladas de várias espécies de *Desulfovibrio* e caracterizadas do ponto de vista bioquímico e estrutural, em particular no que se refere aos seus centros metálicos. Vários centros metálicos foram pela primeira vez identificados e caracterizados em proteínas isoladas neste tipo de microorganismos [13, 14].

Cinco proteínas contendo centros não-hémicos mononucleares de ferro foram isoladas deste género de bactérias redutoras de sulfato; para algumas foram já determinadas as suas estruturas tridimensionais, enquanto que para outras foi apenas efectuada uma caracterização parcial dos seus centros metálicos utilizando métodos espectroscópicos. Na tabela I.1 são apresentadas várias características bioquímicas e estruturais de proteínas não-hémicas com centros mononucleares de ferro isoladas de bactérias redutoras de sulfato. Na figura I.1 representam-se diagramas das estruturas conhecidas e dos respectivos centros metálicos.

Tabela I.1. Caracterização bioquímica e estrutural de proteínas não-hêmicas com centros mononucleares de ferro isoladas de bactérias reductoras de sulfato.

Proteína {M(kDa)}	Fe/monômero (monômeros/molécula)	E_o' (mV)	Ligandos do ferro / geometria
Desulfoferredoxina^b			
<i>D. d.</i> [15] {14}	2 (2)	+4, +240	Tipo Rb ^c / tetrahédrica distorcida; 4 His, 1 Cys / piramidal
<i>D. v.</i> [16] {2x14}	2 (2)	+2, +90	quadrangular
Desulforedoxina^b {2x4}			
<i>D. g.</i> [17]	1 (2)	-35	Tipo Rb ^c / tetrahédrica distorcida
Rubredoxina^b {5-6}			
<i>D. d.</i> , <i>D. v.</i> , <i>D. g.</i> [18]	1 (1)	entre -5 e 0	4 Cys / tetrahédrica
Neelaredoxina^a {14}			
<i>D. g.</i> [19]	2 (1)	+190, +190	Semelhante ao centro II da DFX [19]
Rubreritrina^b {2x22}			
<i>D. v.</i> [20]	3 (2)	+230 centro tipo Rb [20], +281, +339, +246 [22]	Tipo Rb ^c / tetraédrico; 5 Glu, 1 His / dinuclear de ferro ligando por ponte do tipo oxo e octaédrico por Fe [23]
<i>D. d.</i> [21]			
Nigerritrina^a {2x27}			
<i>D. v.</i> [22]	3-4 (2)	+213, +300, +209	Tipo Rb ^c ; semelhante ao centro dinuclear de Fe da Rr ^d [22]

Os valores de E_o' são referidos na mesma ordem que os ligandos dos centros de ferro e a sua geometria. Método usado para a caracterização do centro metálico: ^aespectroscopia; ^bcristalografia de raios-X; ^cRb: rubredoxina; ^dRr: rubreritrina

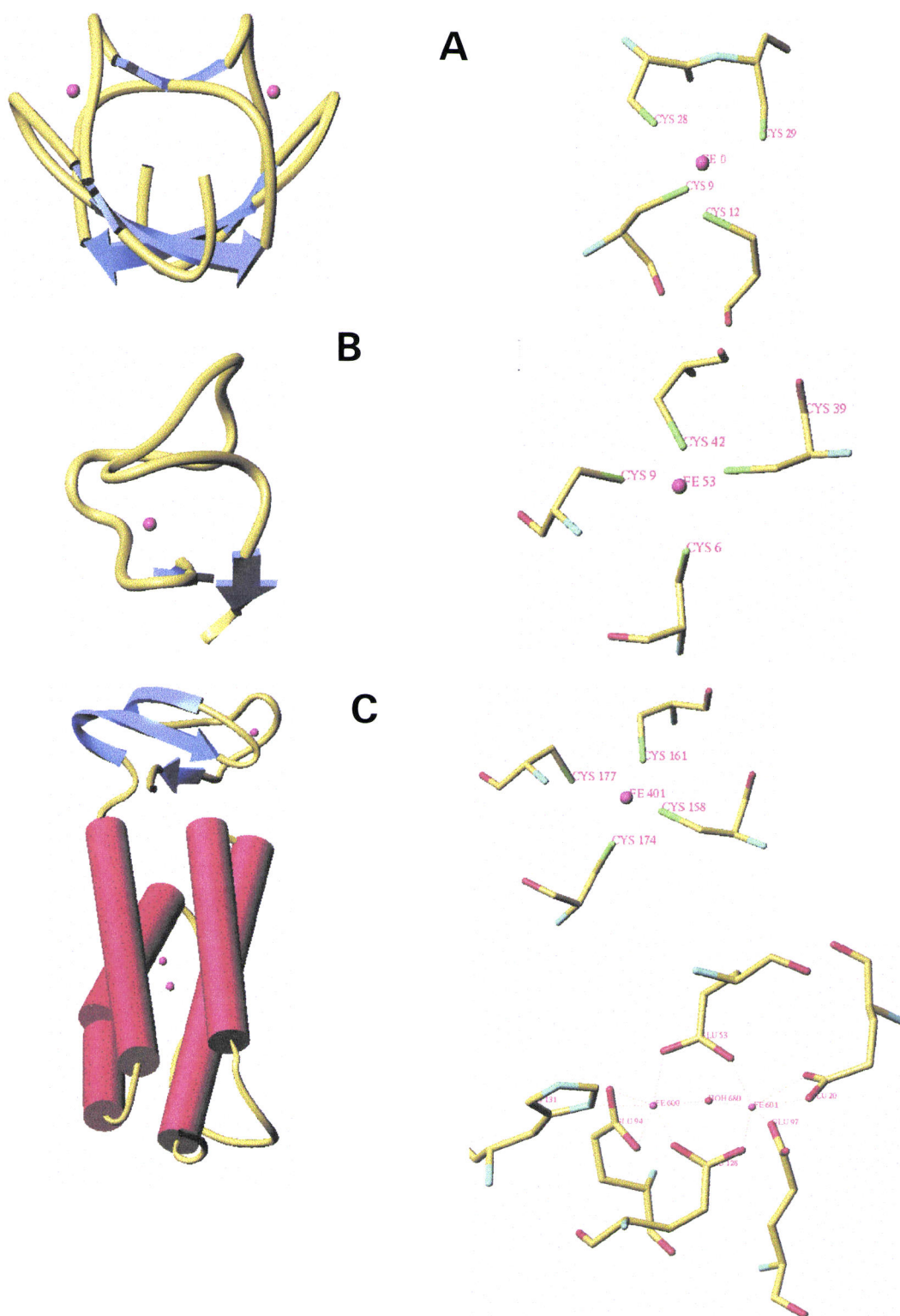


Figura I.1. Representação das estruturas tridimensionais das proteínas com centros mononucleares de ferro não hémicos isoladas de bactérias redutoras de sulfato do género *Desulfovibrio*. A cadeia polipeptídica está representada a azul para as fitas β , a vermelho para as hélices α e a amarelo para as zonas de enrolamento aleatório. Os átomos de ferro estão representados a magenta. É apresentada paralelamente a coordenação dos centros metálicos para as várias proteínas; aqui a coloração é efectuada de acordo com o tipo de átomo. **A)** estrutura da desulfoferrodoxina isolada *D.g.*; **B)** estrutura da rubredoxina isolada de *D.d.*; **C)** estrutura da rubreritrina isolada de *D.d.*

A actividade biológica de todas as proteínas listadas na tabela I.1, à excepção da rubredoxina [11, 24], é ainda desconhecida [15, 16, 17, 18, 25]. No entanto, para todas elas foi proposto um papel nos processos de transferência electrónica e nalguns casos pesquisados eventuais parceiros redox [25], enquanto que para algumas foram sugeridas actividades enzimáticas [11, 24, 26, 27, 28] conforme se sumariza na tabela I.2.

Tendo a desulforedoxina (DX) características semelhantes às da proteína cuja estrutura foi descrita e analisada no presente trabalho, passará a apresentar-se uma breve descrição das suas propriedades bioquímicas e estruturais.

1.2.1. Desulforredoxina

A comparação entre dados de difracção recolhidos para os cristais da proteína nativa e cristais obtidos a partir de proteína reconstituída com índio, em substituição do ferro, foi utilizada para a localização dos átomos de ferro e posterior determinação da estrutura da DX por cristalografia de raios-X [31].

Cada monómero da DX contém um centro metálico FeCys₄ do tipo rubredoxina [18] com um arranjo tetrahédrico distorcido. Os dois monómeros que constituem a molécula estão relacionados por um eixo binário não cristalográfico, interagindo fortemente entre si através de pontes de hidrogénio e apresentando um enrolamento do tipo barril- β , com os dois centros de ferro localizados em pólos opostos da molécula. A elevada estabilidade do dímero assim constituído explica o facto deste não sofrer dissociação completa, mesmo nas condições experimentais usadas para determinações utilizando a técnica de espectrometria de massa de *electrospray* [31].

Tabela I.2. Actividades enzimáticas e fisiológicas e localização celular de proteínas não-hémicas isoladas de bactérias redutoras de sulfato

Proteína	Localização celular	Parceiros redox ^a [19]	Actividade enzimática / Papel fisiológico
Desulfoferrodoxina <i>D. d.</i> <i>D. v.</i>	desconhecida	H ₂ /Hase/cyt c ₃	não NRO ^b [21] SOD ^c [28]
Desulfoferrodoxina <i>D. g.</i>	desconhecida	H ₂ /Hase/cyt c ₃	desconhecido
Rubredoxina <i>D. d.</i> , <i>D. v.</i> , <i>D. g.</i>	citoplasma [3]	- H ₂ /Hase/cyt c ₃ H ₂ /Hase/cyt c ₃ e NAD/NRO	Rb isolada de <i>D. g.</i> está envolvida na cadeia de transferência electrónica entre nucleótidos de piridina e o O ₂ [11, 24]
Neelaredoxina <i>D. g.</i>	desconhecida	H ₂ /Hase/cyt c ₃ e NAD/NRO	desconhecido
Rubreritrina <i>D. v.</i> <i>D. d.</i>	periplasma ou citoplasma [29]	- -	Para a proteína isolada de <i>D. v.</i> SOD ^c [26], ferroxidase [27] homeostase do ferro(?) [30]
Nigerrythrin <i>D. v.</i>	citoplasma [22]	-	homeostase do ferro(?) [30]

^a H₂/Hase/cyt c₃: redução pelo H₂ na presença de hidrogenase e citocromo tetrahémico c₃ isolado de *D. g.*; NAD/NRO: redução pela oxidoreductase de rubredoxina dependente do NAD; ^b NRO: oxidoreductase de rubredoxina dependente do NAD; ^c SOD: superóxido dismutase.

Apesar das semelhanças existentes entre as estruturas tridimensionais da DX e das rubredoxinas não se verifica uma elevada homologia entre as suas sequências de aminoácidos, sendo os únicos resíduos conservados as cisteínas que coordenam os centros de ferro e alguns resíduos vizinhos.

1.2.2. Desulfoferrodoxina

A desulfoferrodoxina (DFX) foi isolada da bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio (D.) desulfuricans* ATCC 27774 (*D.d.*) crescida em meio de nitrato [15] e de *D. vulgaris* Hildenborough (*D.v.*) crescida em meio de sulfato [15, 16]. A sua massa molecular e a sua composição em subunidades foram determinadas por cromatografia de exclusão molecular e por electroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE). Moura *et al* determinaram a existência de um monómero com massa molecular 14kDa [15], enquanto Verhagen *et al*, sugerem que a proteína é um dímero com massa molecular 2 x 14 kDa [16]. Utilizando a técnica de espectrometria de massa de *electrospray* foi determinada a massa molecular 13881.3 Da para a proteína isolada de *D. desulfuricans* [32]. Para a proteína isolada de ambas as estirpes foi determinado um conteúdo em ferro de dois átomos por monómero.

A DFX foi isolada de *D. desulfuricans* ATCC 27774, em condições aeróbicas, em dois estados de oxidação: o oxidado, forma cinzenta (*grey*) e a forma semi-reduzida (*pink*). A proteína pode ser interconvertida entre os dois estados através da adição de um agente redutor ou oxidante adequado [33]. Estudos espectroscópicos da DFX, utilizando técnicas de espectrofotometria de ultravioleta-visível e de espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica e de Mossbauer [15, 34], sugerem a existência de dois centros de ferro diferentes: o centro I semelhante ao centro da desulforedoxina

(DX), coordenado por quatro cisteínas com uma geometria tetrahédrica distorcida, e o centro II com uma coordenação octahédrica na sua maioria por ligandos azoto e/ou oxigénio. A possibilidade de uma coordenação pentagonal para este centro não foi, no entanto, completamente excluída [32]. Posteriormente, estudos efectuados utilizando a técnica de espectroscopia de ressonância de Raman sugeriram uma coordenação parcial pelo átomo de enxofre de um resíduo de cisteína para o centro II na forma reduzida e uma provável coordenação pelos enxofres de duas cisteínas e pelo menos o átomo de azoto de uma histidina para a forma oxidada deste centro [34]. A subsequente determinação da sequência de aminoácidos da DFX mostrou a existência de apenas cinco resíduos cisteína, sugerindo que se quatro deles estão envolvidos na coordenação do centro I apenas um estará disponível para coordenar o centro II [32]. Os potenciais redox para cada um dos centros de ferro da DFX são 4 e 240 mV, respectivamente, para o centro I e II. A grande diferença entre estes valores permite a separação da proteína em três estados de oxidação. O elevado valor do potencial redox para o centro II explica a estabilidade da forma semi-reduzida em condições aeróbicas. A sequência de aminoácidos da DFX isolada de *D.d.* foi determinada por Devreese *et al* [32], enquanto que para a proteína isolada de *D.v.* foi deduzida a partir da sequência nucleotídica do gene que para ela codifica [35]. À esta última proteína foi atribuída por Brumlik *et al* a designação de rubredoxina oxidoreductase (*rbo*) por considerarem a proteína codificada por este gene como um potencial parceiro redox para a rubredoxina, uma vez que a sua grelha aberta de leitura (*opening reading frame*) está a montante do gene que codifica para a rubredoxina. As duas moléculas de DFX apresentam uma identidade de sequência de 77%.

A DX apresenta uma homologia de 53% com os primeiros 36 resíduos da DFX isolada de *D.d.* (domínio I) e 56% de homologia com a proteína isolada de *D.v.*. A

região do N-terminal do domínio II da DFX apresenta cerca de 50% de identidade com a região N-terminal da neelaredoxina (NI). O alinhamento das sequências de aminoácidos das quatro proteínas é apresentado na figura I.2. A semelhança que existe entre a DX e a zona correspondente do gene *rbo* conduziu Brumlik *et al* [36] a sugerir que este gene poderia ser o produto da fusão entre o gene que codifica para a DX e o gene que codifica para outra proteína envolvida em processos redox. São várias as evidências que sugerem a neelaredoxina como um candidato natural [25]. A DFX foi encontrada apenas em *D.d.* e *D.v.* e não em *Desulfovibrio gigas* (*D.g.*). Por outro lado, a DX e a NI foram apenas encontradas em *D.g.* e não em *D.d.* e *D.v.* [17, 25]. As homologias de sequência verificadas entre a DFX e a NI associadas aos resultados obtidos a partir de estudos efectuados a pH neutro por espectrofotometria de ultravioleta visível e espectroscopia de RPE, sugerem a existência de semelhanças estruturais entre o centro de ferro NI e o centro II da DFX [25].

```

1                                     M-K-MYDMFQTADW
2  PKHLEVYKCTHCGNIVEVLHGGGAELVCCGEPM-KHMVEGS-T-DG
3  PNQYEIYKCIHCGNIVEVLHAGGGDLVCCGEPM-KLMKEG--TSDG
4  ANEGDVYKCELCGQVVKVLEEGGGTLVCCGEDMVKQ

1  KTEKHVPAIEXDDAVA
2  AMEKHVPVIEKVDGGYLIKVGSVPHPMEEKHWIEWIELLADGRSYT
3  AKEKHVPVIEKTANGYKVYVGSVAHPMEEKHWIEWIELVADGVSYK

2  KFLKPGDAPEAEFFAIDASKVTAREYCNLHGHWKAEN
3  KFLKPGDAPEAEFCIKADKVVAREYCNLHGHWKAEA

```

Figura I.2. Alinhamento das sequências de aminoácidos da DFX e proteínas relacionadas. 1: N-terminal da NI de *D.g.*; 2: DFX isolada de *D.d.*; 3: DFX isolada de *D.v.*; 4: DX isolada de *D.g.*. Os resíduos representados a cheio são comuns a ambas as sequências de DFX. Os resíduos da DX ou da NI comuns aos conservados nas duas sequências da DFX são também representados a cheio. Esta figura foi adaptada da figura 3 da referência [32].

Ainda não foi determinado o papel fisiológico e identificados os parceiros redox da DFX. A designação de oxidoreductase da rubredoxina dependente do NAD (*rbo*) atribuída por Brumlik *et al* [35] não foi confirmada experimentalmente por Moura *et al* [18]. Estes autores não detectaram a existência de transferência electrónica entre nucleótidos de piridina reduzidos e a DFX. A redução da DFX pelo hidrogénio molecular mediada pelo par hidrogenase/citocromo tetrahémico *c3*, verificada por Chen *et al* [19], não permite tirar conclusões devido a inespecificidade da reactividade deste par para proteínas não hémicas de ferro. Foi recentemente verificado por Pianzola *et al* [28] que a superprodução do produto do gene *rbo* de duas espécies de *Desulfovibrio*, *vulgaris* e *baarsii*, suprime de um modo eficiente os efeitos nocivos devidos à ausência de superóxido dismutase em *Escherichia coli*. No entanto, se fosse utilizada apenas a sequência do domínio N-terminal, correspondente à proteína DX, a deficiência em superóxido dismutase não era complementada. O mecanismo de actuação da DFX não foi clarificado, sendo pouco provável que a DFX seja um análogo da superóxido dismutase, proteína isolada e caracterizada em *D.d.* [37] e com actividade identificada em *D.v.* [38]. No entanto, um envolvimento nos mecanismos de tolerância ao oxigénio é sugerido para a DFX [28].

2. Proteínas de outros organismos com centros mononucleares de ferro ou com centros multinucleares de ferro coordenados por átomos de azoto e enxofre

Centros mononucleares de ferro com uma coordenação combinada por ligandos azoto e oxigénio foram já descritos, por exemplo, no centro de ferro não-hémico do centro de reacção fotossintético [39], ou para os centros metálicos das transferinas [40-42], das dioxigenases [43-47], de superóxido dismutases [48] e da uridilotransferase de 1-

fosfato de galactose [49]. Nestes casos, os ligandos mais frequentes são resíduos de histidina, glutamato ou aspartato e moléculas de água, sendo menos frequente a coordenação por resíduos tirosina e pelo grupo carboxilato do C-terminal. As geometrias preferenciais para estes centros metálicos são a tetraédrica e a octaédrica.

Foram apenas recentemente determinadas estruturas tridimensionais de proteínas de ferro com uma combinação de ligandos enxofre e azoto. Centros mononucleares deste tipo foram descritos para o complexo da sintetase de isopenicilina *N* com o seu substrato [50] e para a hidratase de nitrilo [51]. Na primeira estrutura o átomo de ferro apresenta uma coordenação em pirâmide quadrangular por átomos de azoto de dois resíduos histidina, o oxigénio do grupo carboxilato de um aspartato, uma molécula de água e por um átomo de enxofre constituinte do substrato. Na estrutura da hidratase de nitrilo o átomo de ferro apresenta uma coordenação octaédrica incompleta por três átomos de enxofre provenientes de resíduos cisteinil e por dois átomos de azoto provenientes de grupos amina da cadeia principal (ver figura I.3). A sexta posição de coordenação está acessível ao centro activo. O plano equatorial do octaédro é definido por um quelato de 11 átomos pertencentes aos resíduos de 113 a 115, incluindo os dois ligandos azotados e os dois enxofres das cisteínas 113 e 115. Os autores deste estudo sobrepõem este plano com o plano definido pelos quatro átomos de azoto dos anéis pirrólicos e o átomo de ferro de um grupo hémico. A hidratase de nitrilo é o único enzima para o qual foi descrito um centro de ferro coordenado apenas por átomos de azoto e enxofre, sendo também invulgar a coordenação por grupos amina da cadeia polipeptídica.

Centros multinucleares de ferro com ligandos enxofre e azoto podem ser observados nos agregados como a “almondega” (*Meatball*) encontrado numa proteína isolada de *D.v.* Hildenborough, onde um dos quatro átomos de ferro do agregado apresenta uma

coordenação do tipo FeSNO_2X [13] e na proteína de ferro e enxofre “Rieske” [52], onde um dos dois átomos de ferro apresenta um arranjo tetraédrico com dois átomos de enxofre também ligados ao segundo átomo de ferro e dois azotos pertencentes a resíduos histidina.

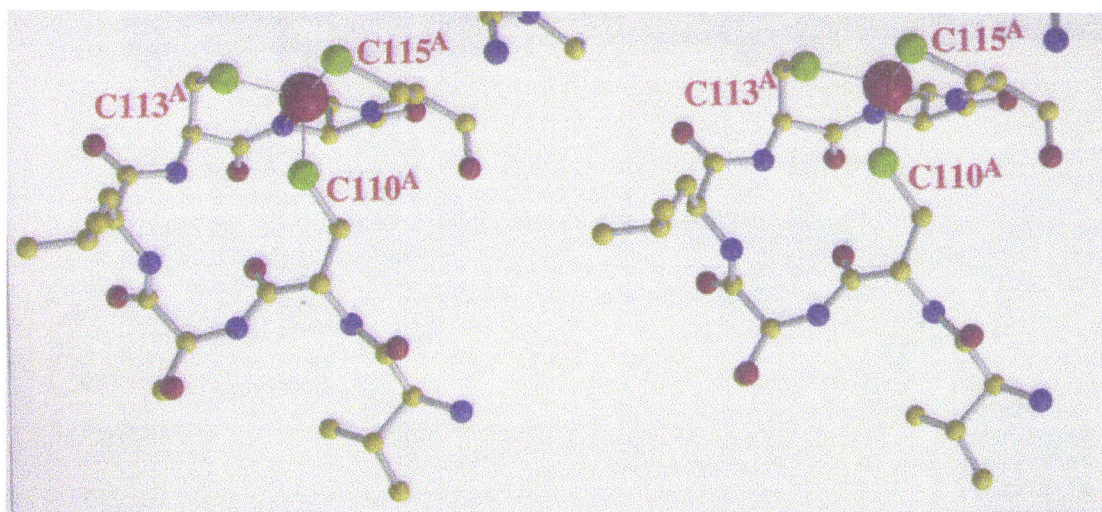


Figura I.3. Representação em estéreo da coordenação do centro de ferro da hidratase de nitrilo. São átomos ligantes os enxofres das cisteínas 110, 113 e 115 e os azotos dos grupos amina da cadeia principal pertencentes aos resíduos Ser114 e Cys115. O átomo de ferro é representado por uma esfera vermelha e os restantes átomos coloridos de acordo com o tipo de elemento a que pertencem. Figura reproduzida a partir da figura 6a da referência [51].

II. PARTE EXPERIMENTAL

A. DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA DA DESULFOFERRODOXINA ISOLADA DE *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774

O método de cristalografia de raios-X de cristal único utiliza o fenómeno de difracção para a determinação de estruturas moleculares. O fenómeno de difracção por cristais só é possível pelo facto do comprimento de onda da radiação X ser da mesma ordem de grandeza das distâncias interatómicas, e resulta da interacção desta com os electrões existentes nos orbitais atómicos.

O físico von Laue foi o primeiro a estabelecer as relações matemáticas que permitiram explicar o fenómeno da difracção por um cristal. De um modo simplificado pode descrever-se a difracção como o resultado da interferência construtiva em determinadas direcções do espaço da radiação dispersada em todas as direcções por cada um dos átomos da estrutura cristalina. Posteriormente, W. L. Bragg explicou o fenómeno de difracção de um modo mais simplificado considerando-o como um fenómeno de reflexão produzido pela radiação X nos planos da rede cristalina. Formalmente os dois tratamentos matemáticos, a equação de Laue e a lei de Bragg, são equivalentes, sendo a lei de Bragg de utilização mais comum.

O processo de determinação da estrutura de proteínas por cristalografia de raios-X por monocristais é um processo complexo que envolve várias fases, conforme está esquematizado de um modo simplificado na figura IIA.1.

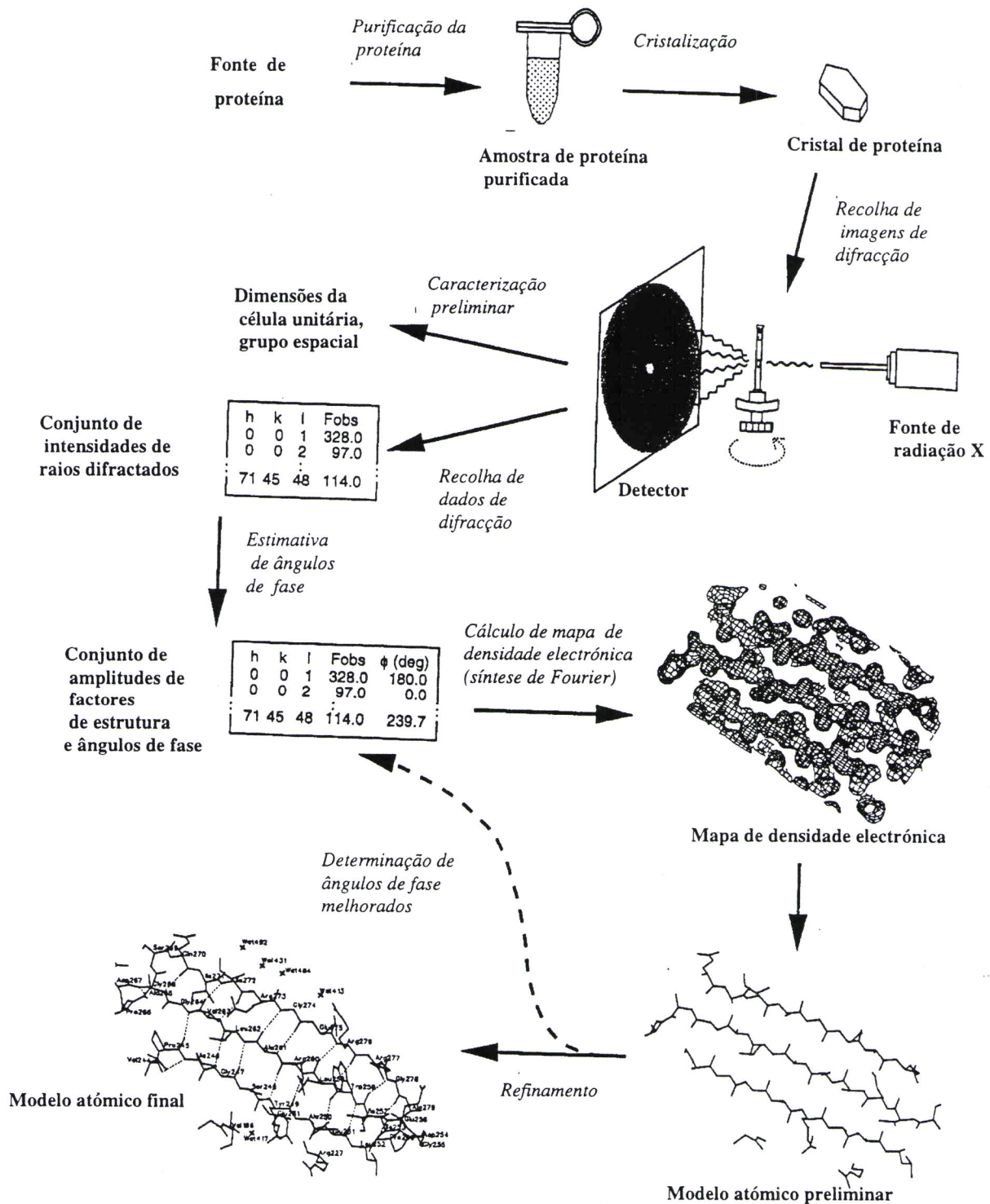


Figura IIA.1. Etapas da determinação da estrutura de proteínas por cristalografia de raios-X. Figura adaptada da referência [53].

O procedimento experimental seguido para a determinação da estrutura da desulfoferrodoxina é descrito nos vários capítulos da parte II, sendo para cada fase do procedimento apresentada uma breve introdução.

1. Cristalização da desulfoferrodoxina isolada de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774

O estudo, num cristal, de um arranjo periódico de N motivos que se repetem nas três direcções do espaço permite a determinação da estrutura do motivo que se repete, o que não é possível para um motivo isolado (por exemplo, a molécula de proteína). Por isso, a primeira fase para a determinação de uma estrutura por cristalografia de raios-X é o estabelecimento de condições de cristalização que permitam a obtenção de cristais de dimensões adequadas e com boa qualidade de difracção.

A amostra de proteína a ser usada em ensaios de cristalização deve ser bastante pura quer em termos da contaminação da solução por outras macromoléculas ou por outros componentes que de algum modo interfiram no processo de cristalização, quer em termos da homogeneidade conformacional das moléculas de proteína presentes.

Para que ocorra cristalização é necessário provocar a existência de condições de sobressaturação, o que gera a formação de núcleos de cristalização e posteriormente o seu crescimento.

1.1. Materiais e Métodos

A proteína foi purificada a partir de células crescidas em meio de nitrato segundo o protocolo descrito por Moura *et al* [15]. As amostras de proteína foram purificadas pela Prof. Doutora Isabel Moura e pelo Doutor Pedro Tavares (FCT/UNL) a partir de extractos celulares fornecidos pelo Prof. Doutor Jean Le Gall (Universidade da Georgia, Athens, EUA), no âmbito de um projecto de colaboração.

A pureza da solução de proteína foi verificada por electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. A amostra de proteína foi considerada suficientemente pura quando, após coloração do gel com azul de Coomassie, foi observada apenas uma banda correspondente a um valor de massa molecular de aproximadamente 14 kDa. As amostras de proteína foram guardadas à temperatura de -20°C.

Dado o rendimento do processo de purificação ser superior para a forma *rosa* em relação à forma *cinzenta* a generalidade dos ensaios de cristalização foram efectuados com amostras de desulfoferrodoxina purificadas na forma *rosa*; por isso, só estes irão ser referidos.

Os reagentes utilizados possuíam grau de pureza pro-análise. As soluções usadas nos ensaios de cristalização foram preparadas com água desionizada e filtradas através de membranas Millipore com dimensão de poro de 0.45 µm, para remover sólidos em suspensão. Com o objectivo de evitar a contaminação por microorganismos adicionou-se azida de sódio às soluções de agentes precipitantes de modo a obter uma concentração 0.1% (m/v) neste sal.

Os ensaios de cristalização foram efectuados recorrendo ao método de difusão de vapor utilizando caixas para cultura de células Linbro com 24 reservatórios. A gota

preparada adicionando a solução de proteína e a solução de cristalização foi colocada sobre uma lamela de vidro silanizada ou sobre um suporte de poliestireno introduzido no reservatório [54], consoante se procedeu à preparação de uma gota suspensa ou assente. A solução de cristalização (cerca de 700 μ L) foi colocada no reservatório, este foi coberto com a lamela de vidro, no caso da gota suspensa, ou com uma lamela de plástico, no caso da gota assente, e vedado com silicone.

Os ensaios de cristalização preliminares foram efectuados utilizando a técnica da gota suspensa. Os agentes precipitantes e soluções tampão utilizados foram os de uso mais comum em cristalização de proteínas, nomeadamente, usou-se sulfato de amónio, etanol e polietilenoglicol (PEG) de massas moleculares 4 000, 6 000 e 8 000 Da, e as soluções tampão acetato-NaOH, Tris maleato e Tris-HCl, cobrindo o intervalo de pH entre 4 e 8. Posteriormente foi utilizado um conjunto de soluções estabelecidas através de design factorial incompleto [55] com o objectivo de pesquisar um leque mais alargado de condições de cristalização (ver Apêndice). A optimização das condições que conduziram a melhores resultados implicou a repetição de ensaios a diferentes temperaturas (4, 10, 16 e 20°C), a utilização de diferentes técnicas de cristalização (gota assente e gota suspensa), de aditivos, de várias concentrações de proteína e dos agentes precipitantes e de vários valores de pH para as soluções tampão. Foram também utilizadas diferentes proporções relativas de solução de proteína e de solução de cristalização na preparação das gotas.

1.2. Resultados

Os ensaios de cristalização preliminares apenas permitiram obter formas cristalinas múltiplas, sempre na presença de polietilenoglicol e com maior reprodutibilidade a pH entre 5.0 e 6.0. A adição de MPD e dioxano à solução de cristalização em concentrações entre 2 e 5% (v/v) não permitiu eliminar o carácter múltiplo dos cristais obtidos, contrariamente ao verificado noutras situações [56]. Ensaios de cristalização repetidos variando outros factores acima referidos numa tentativa de otimizar a qualidade dos cristais foram também ineficazes.

A pesquisa utilizando soluções estabelecidas através de design factorial incompleto apresentou melhores resultados para duas soluções que originaram formas cristalinas múltiplas e com arestas irregulares: 25% (m/v) PEG 4 000, HEPES-NaOH 0.1M pH 7.2, CaCl₂ 0.2 M e 30% (m/v) PEG 8 000, MES-NaOH 0.1M pH 6.6, tartarato de sódio e potássio 0.2M.

As condições de cristalização que conduziram com maior reprodutibilidade à obtenção de melhores cristais foram: 20% PEG 4 000 (m/v) HEPES-NaOH 0.1M pH 7.5 CaCl₂ 0.2 M, utilizando a técnica de gota assente e uma proporção de solução de proteína para solução de cristalização de 2:1. A adição de uma quantidade estequiométrica de hexacianoferrato de potássio à solução de proteína antes da adição da solução de cristalização permitiu reduzir significativamente o número de cristais múltiplos por ensaio de cristalização [57].

Foram obtidos cristais únicos às várias temperaturas testadas. No entanto, se a temperatura não se mantivesse estável durante o processo de cristalização apenas se obtinham cristais múltiplos. A diferentes temperaturas obtêm-se diferentes formas cristalinas: a temperaturas mais baixas (4 e 10°C) obtêm-se prismas triangulares, a

20°C prismas rectangulares e a 16°C surge uma mistura de ambas as formas. As diferentes formas cristalinas podem ser observadas nas figuras IIA.2 e IIA.3.

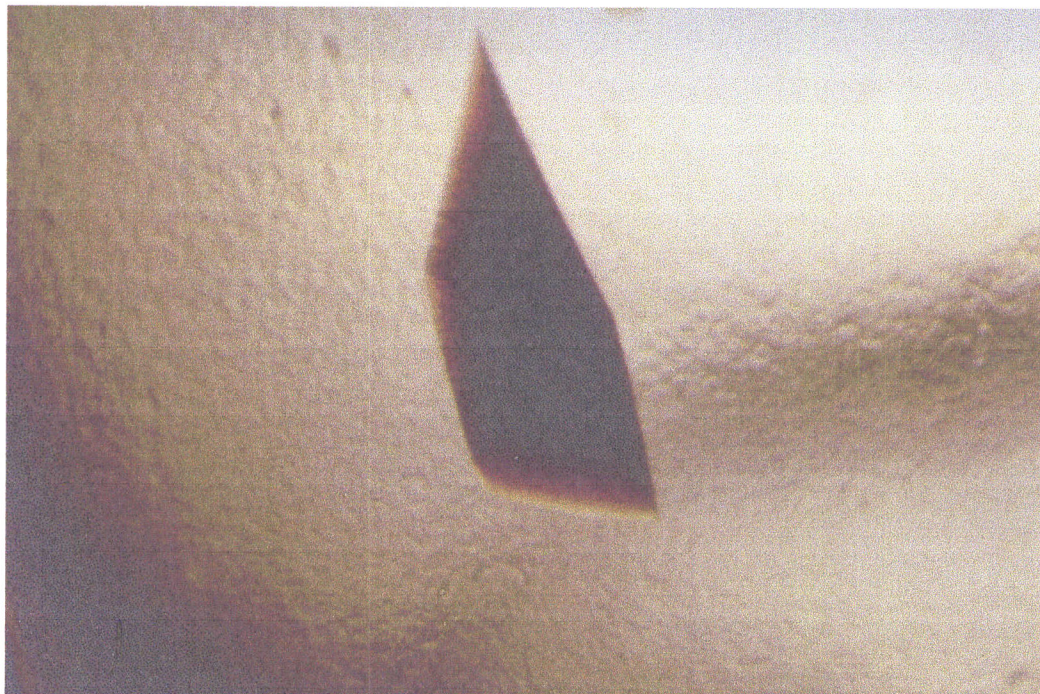


Figura IIA.2. Cristais romboédricos de desulfoferrodoxina crescidos na presença de hexacianoferrato de potássio a 4°C (prismas trigonais com dimensões máximas 0.4 x 0.4 x 1.0 mm).

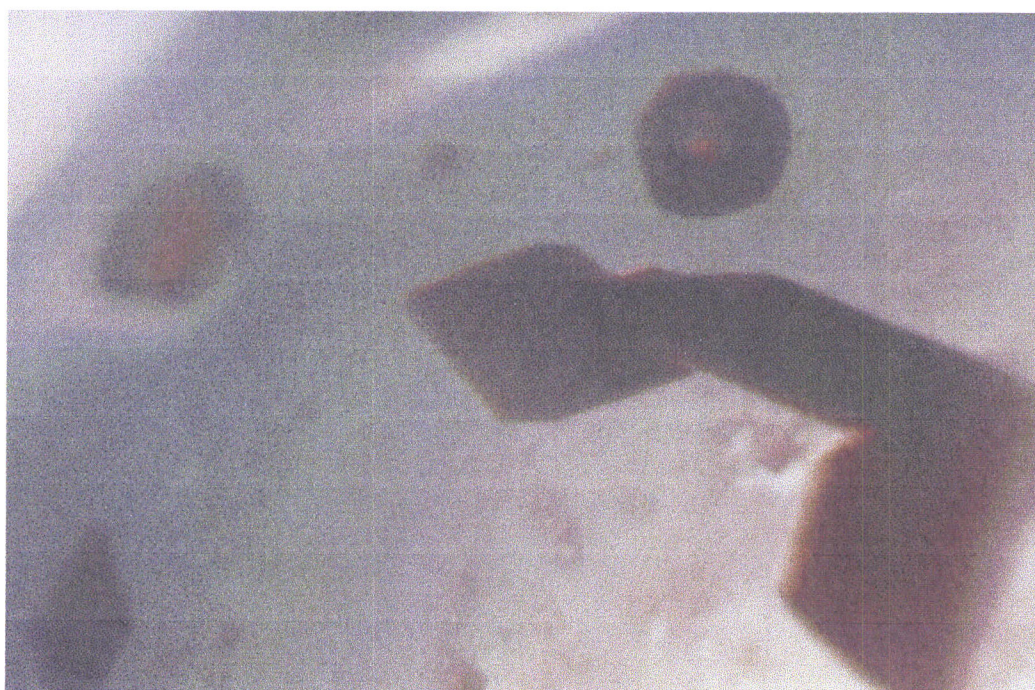


Figura IIA.3. Cristais monoclinicos de desulfoferrodoxina crescidos na presença de hexacianoferrato de potássio a 16°C (prismas rectangulares com dimensões máximas 0.4 x 0.4 x 0.3 mm).

Para qualquer das três temperaturas observa-se a formação de um precipitado cristalino cerca de 4 dias após a preparação do ensaio de cristalização. Após mais dois dias, surgem pequenos cristais que demoram cerca de 15 dias (tempo total) a atingir as suas dimensões máximas, enquanto se observa uma diminuição da quantidade de precipitado. Se no início do processo de formação dos cristais o reservatório contendo a gota for aberto e esta perturbada observa-se a formação de placas irregulares espessas (ver figura IIA.4)

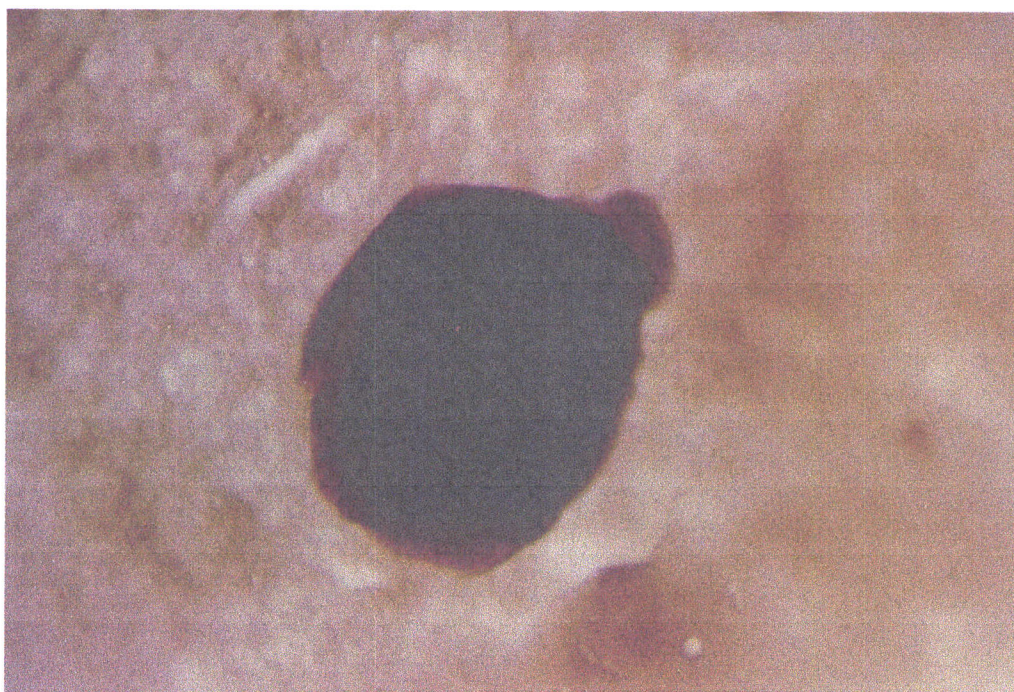


Figura IIA.4. Placas irregulares crescidas na presença de hexacianoferrato de potássio a 4°C após perturbação da gota durante o processo de cristalização (dimensões máximas 0.4 x 0.4 x 0.2 mm).

A qualidade e as dimensões dos cristais com hábito cristalino de prisma triangular demonstraram ser sistematicamente melhores que as das outras formas cristalinas. Por isso, utilizou-se este tipo de cristais crescidos a 4°C para a determinação da estrutura da desulfoferrodoxina.

Os cristais desta forma cristalina de maiores dimensões (0.4 x 0.4 x 1.0 mm) foram obtidos com uma concentração inicial de proteína de 45 mgmL⁻¹. Cristais de menores

dimensões foram obtidos com uma concentração de 16 mgmL^{-1} . Verificou-se ainda que a presença de CaCl_2 é indispensável para a sua formação, e que o aumento da concentração deste sal até 0.2 M implica um aumento nas dimensões dos cristais obtidos. Com o objectivo de verificar qual dos iões, cálcio ou cloro, é necessário para o processo de cristalização procedeu-se à substituição na solução de cristalização do CaCl_2 por $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e por NaCl . Apenas foi observada a formação de cristais na presença de iões cálcio.

A massa molecular do polietilenoglicol presente na solução de cristalização influencia também significativamente a qualidade dos cristais obtidos. Nomeadamente, a utilização de PEG 6 000 em substituição do PEG 4 000 conduz à formação de cristais múltiplos, como pode ser observado na figura IIA.5.



Figura IIA.5. Cristal múltiplo obtido na presença de ferricianeto de potássio a 4° C utilizando PEG 6 000 em substituição de PEG 4 000.

Procedeu-se também à cristalização da desulfoferrodoxina na presença de ascorbato de sódio. Este agente redutor foi adicionado numa proporção estequiométrica à solução de proteína em substituição do hexacianoferrato de potássio. Foi observado um comportamento idêntico durante o processo de cristalização e obtidas as duas formas cristalinas já descritas. As figuras IIA.6 e IIA.7 mostram, respectivamente, os prismas triangulares e as placas irregulares, sendo de notar a cor mais rosada destes cristais relativamente aos obtidos na presença de hexacianoferrato de potássio de cor mais acastanhada.

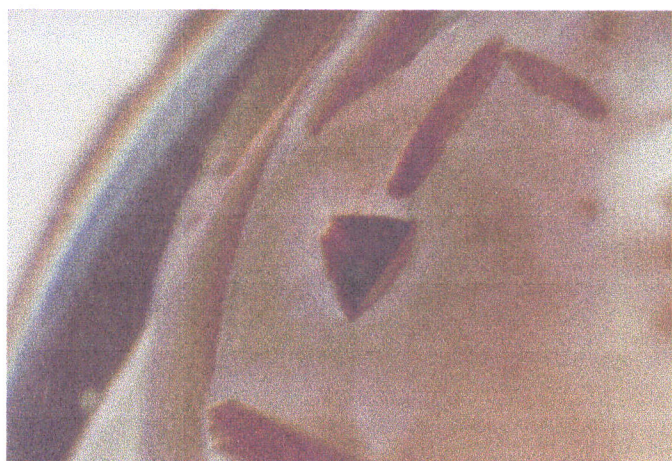


Figura IIA.6. Cristais romboédricos de desulfoferrodoxina crescidos na presença de ascorbato de sódio a 4°C (prismas trigonais com dimensões máximas 0.4 x 0.4 x 1.0 mm).



Figura IIA.7. Placas irregulares crescidas na presença de ascorbato de sódio a 4°C após perturbação da gota durante o processo de cristalização (dimensões máximas 0.4 x 0.4 x 0.2 mm).

2. Congelação dos cristais de desulfoferrodoxina

Os cristais de macromoléculas podem ser muito susceptíveis à destruição pela radiação devido à presença de grandes quantidades de água e à facilidade de difusão na amostra. Os raios-X incidentes podem provocar a ionização imediata das moléculas presentes no cristal desencadeando posteriormente outras reacções químicas. Não só a proteína, mas também a água presente no cristal são fontes de radicais que são produzidos quer por radiólise directa quer através de reacções iniciadas por outros radicais. A presença da água facilita também a difusão dos radicais mediando a produção de danos em regiões distantes do seu local de origem.

Com o objectivo de reduzir os danos provocados no cristal pela radiação X e preservar a qualidade do padrão de difracção durante as recolhas de dados é importante efectuarlas a temperaturas criogénicas. Este procedimento permite eliminar praticamente por completo a difusão de radicais no cristal e conseqüentemente, aumenta o tempo de vida dos cristais expostos a radiação sem diminuição significativa do seu poder de difracção. A utilização de temperaturas criogénicas implica o estabelecimento das condições usadas para congelação rápida dos cristais. Se a solução de cristalização não forma um filme vítreo quando sujeita ao processo de congelação ou se os cristais sofrem danos durante este processo é necessário adicionar uma substância crioprotectora à solução de cristalização.

2.1. Materiais e Métodos

Os testes para a optimização das condições de congelação dos cristais de desulfoferrodoxina envolveram a utilização de várias concentrações de diferentes

crioprotectores (glicerol, MPD, PEG 400, etilenoglicol e glucose) e de diferentes tempos e procedimentos de contacto do cristal com a nova solução de cristalização. Os cristais foram suspensos num filme de solução de cristalização no interior de um laço de fibra muito fina e imediatamente congelados numa corrente de azoto à temperatura de 100 K utilizando um sistema de congelação da Oxford Cryosystems [58]. A figura IIA.8. exemplifica a montagem do sistema de congelação durante a recolha de dados de difracção.

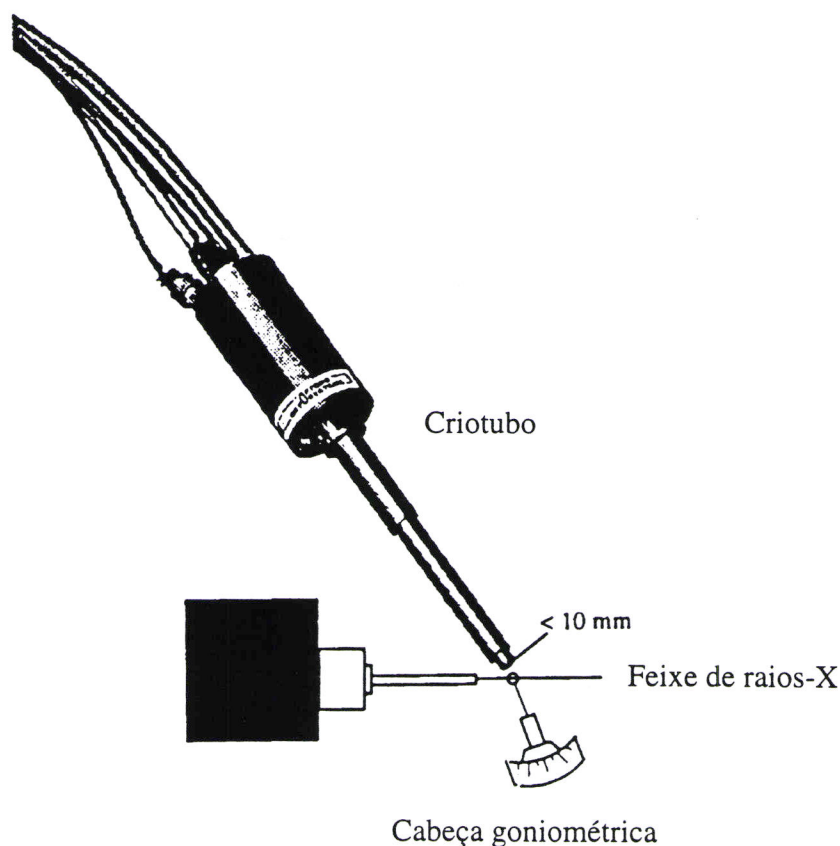


Figura IIA.8. Esquema exemplificativo da montagem do sistema para congelação de cristais utilizado durante a recolha de dados de difracção (adaptado do manual do sistema de congelação da Oxford Cryosystems).

2.2. Resultados

Os melhores resultados foram obtidos transferindo os cristais de desulfoferrodoxina para soluções de cristalização contendo concentrações de glucose gradualmente superiores até um máximo de 15% (m/v). A adição de concentrações superiores de glucose à solução de cristalização provocava a fragmentação dos cristais.

O padrão de difracção de cristais congelados na presença de 15% de glucose apresenta anéis de difracção difusos a valores de resolução característicos da presença de microcristais de gelo (aproximadamente 3.8 Å, 2.2 Å e 1.9 Å) [59], formados possivelmente durante o processo de congelação. Este facto não implicou, no entanto, uma diminuição significativa na qualidade dos dados de difracção recolhidos.

3. Recolha de dados de difracção e caracterização das diferentes formas cristalinas

A constituição de qualquer sistema de recolha de dados de difracção por radiação X inclui uma fonte de radiação, um monocromador ou um filtro usado para seleccionar o comprimento de onda da radiação de trabalho, um colimador cujas dimensões podem ser escolhidas, nomeadamente de acordo com as dimensões do cristal, e um detector. É ainda necessário um sistema mecânico controlado manualmente ou através de um sistema computadorizado que permita movimentar o cristal durante a recolha de dados.

A fonte de radiação mais vulgarmente usada no laboratório é o gerador de anôdo rotativo, constituído por um cátodo emissor de electrões (filamento aquecido) que ao serem acelerados por um campo eléctrico e em vácuo vão chocar a alta velocidade

com um ânodo metálico provocando transições electrónicas e, conseqüentemente, a emissão de radiação X com determinados comprimentos de onda. A utilização de um ânodo rotativo permite multiplicar as zonas de incidência do feixe de electrões diminuindo o problema do aquecimento excessivo e aumentando a intensidade da radiação produzida. A radiação X produzida em sincrotrão é a fonte de utilização preferencial devido à sua grande intensidade e devido à possibilidade de seleccionar uma vasta gama de comprimentos de onda.

O detector permite medir a posição e a intensidade dos feixes difractados, resultados experimentais usados para a caracterização preliminar do cristal que inclui: determinação das dimensões da célula unitária, do grupo espacial e do número de moléculas por unidade assimétrica. São posteriormente atribuídos os índices de Miller (hkl) e determinada a amplitude dos factores de estrutura $|F_{hkl}|$ proporcional à raiz quadrada da intensidade corrigida de cada mancha de difracção. A função periódica F_{hkl} caracterizada por amplitude, ângulo da fase (α_{hkl}) é posteriormente utilizada para o cálculo da densidade electrónica numa posição x,y,z da célula unitária através da transformada de Fourier dos factores de estrutura

$$\rho(xyz) = 1/V \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| \exp[-2\pi i(hx+ky+lz-\alpha(hkl))].$$

3.1. Materiais e Métodos

Os cristais não submetidos ao processo de congelação foram introduzidos em capilares de vidro, tipo Lindemann (MARK-RÖHRCHEN). O excesso de solução de cristalização depositada em torno do cristal foi removida para evitar que este se mova durante a recolha de dados de difracção. Para proteger o cristal contra uma possível

secagem foi colocada uma quantidade suficiente da solução de cristalização pelo menos num dos extremos do capilar, tendo ambas as extremidades sido posteriormente seladas com cera.

Os cristais submetidos ao processo de congelação são manipulados como já descrito em IIA.2.1.

Os dados de difracção foram recolhidos utilizando o método de oscilação com radiação de sincrotrão ou radiação monocromática Cu-K α produzida por um gerador de anôdo rotativo e utilizando um monocromador de grafite. A escolha da estratégia usada para a recolha das imagens de oscilação dependeu essencialmente do tipo de radiação utilizada e da utilização ou não de cristais congelados. A Tabela IIA.1 resume as condições usadas durante a recolha de dados de difracção para cada cristal. Todos os conjuntos de dados de difracção foram medidos utilizando detectores de superfície fosforescente, vulgarmente denominados *imaging-plate*, da MarResearch com 180 mm de diâmetro.

O conjunto de programas HKL [60] foi utilizado para o processamento dos dados de difracção obtidos, durante o qual as imagens de difracção foram visualizadas e manipuladas com o programa XdisplayF. Após refinar os parâmetros da malha cristalina e do detector o programa DENZO fez a indexação das manchas de difracção e determinou as suas intensidades corrigidas relativamente aos efeitos de Lorentz e à polarização após a subtracção do ruído de fundo. O programa SCALEPACK calculou um factor de escala para cada imagem de difracção em relação a uma tomada como referência, refinou os parâmetros do cristal (dimensões da célula e mosaicidade) usando todo o conjunto de dados e efectuou a sua análise estatística tendo em conta as múltiplas observações relacionadas pela simetria do padrão de difracção.

Tabela IIA.1. Condições utilizadas nas recolhas de difração para a caracterização dos vários tipos de cristais.

Parâmetros	Tipos de cristais				
	hexacianoferrato de potássio	hexacianoferrato de potássio	hexacianoferrato de potássio	hexacianoferrato de potássio	ascorbato de sódio
Crescidos na presença de	prisma triangular	prismas rectangulares	placas irregulares espessas	potássio	prisma triangular
Hábito cristalino	não	não	sim	sim	sim
Sujeito a congelação	não	não	sim	sim	sim
Tipo de radiação X	sincrotrão (estação 9.5, SRS, CCLRC Laboratório Daresbury)	Cu-K α , gerador anódo rotativo Rigaku 4.2 kW (LMB, Univ. Oxford)	Cu-K α , gerador anódo rotativo Enraf-Nonius 4.5 kW (TQB, UNL)	Cu-K α , gerador anódo rotativo Enraf-Nonius 4.5 kW (TQB, UNL)	sincrotrão (estação X31, DESY, EMBL, Hamburgo)
Comprimento de onda (Å)	0.99	1.5418	1.5418	1.5418	0.9091
Distância cristal-detector (mm)	142	89	124	124	170 (alta resolução) 300 (baixa resolução)
Incremento da oscilação (°)	2.0	1.5	1.0	1.0	1.3 (alta resolução) 2.5 (baixa resolução)
Oscilação total (°)	34	117	180	180	91 (alta resolução) 80 (baixa resolução)
Tempo de exposição (min)	1	50	10	10	-

As intensidades de reflexões relacionadas pela simetria do grupo espacial foram combinadas entre si e os seus índices reduzidos, foram também determinados os respectivos factores de estrutura a serem utilizados em cálculos posteriores, utilizando os programas ROTAPREP, SORTMTZ, AGROVATA e TRUNCATE [61].

O número de moléculas de proteína por unidade assimétrica foi determinado tendo em conta a percentagem média de solvente característica para cristais de proteína, entre 28 e 65% [62]. O volume do cristal por unidade de massa molecular (V_M) foi calculado utilizando a equação proposta por Matthews [62],

$$V_M = \frac{V}{Z \times M_p}$$

onde V é o volume da célula unitária (\AA^3), Z é o número de moléculas de proteína na célula unitária e M_p é a massa molecular da proteína (Da). O valor determinado foi convertido em quantidade de solvente presente no cristal (V_{solv}) utilizando a expressão

$$V_{\text{solv}} = 1 - V_{\text{prot}} = 1 - \frac{1.66\bar{v}}{V_M}$$

sendo \bar{v} o volume específico parcial da proteína no cristal, considerado aproximadamente igual a $0.74 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, e V_{prot} a fracção de volume do cristal ocupada pela proteína.

No caso deste método sugerir diferentes conteúdos possíveis para a unidade assimétrica recorreu-se ao cálculo e análise da função de auto-rotação utilizando o programa POLARRFN incluído no bloco CCP4 [61]. As soluções obtidas, após confirmadas através do cálculo da função de Patterson para vários raios de integração e para diferentes intervalos de resolução, permitiram verificar a existência de simetria não cristalográfica entre as moléculas contidas na unidade assimétrica.

3.2. Resultados

A figura IIA.9 mostra os padrões de difracção para os vários tipos de cristais de DFX referidos na tabela IIA.1.

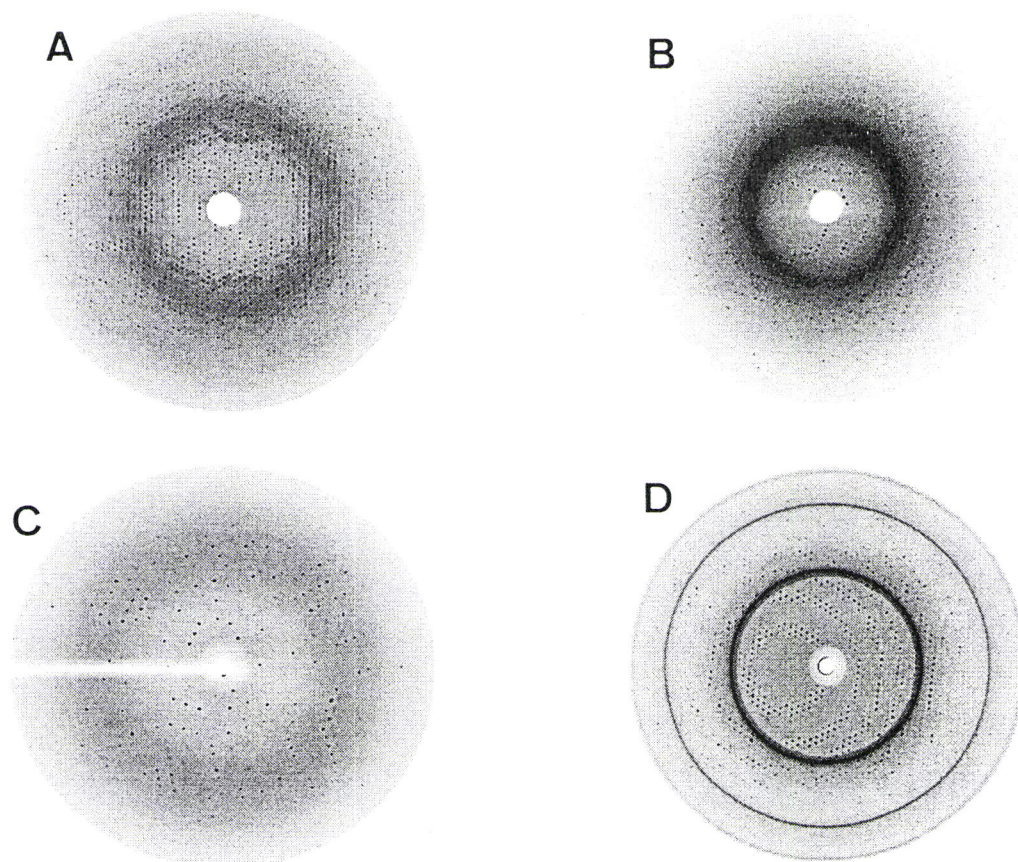


Figura IIA.9. Padrões de difracção para cristais A) romboédrico crescido na presença de hexacianoferrato de potássio, imagem recolhida utilizando radiação de sincrotrão, $\lambda=0.99$ Å, na estação 9.5, SRS, CCLRC Laboratório de Daresbury; Inglaterra, resolução no extremo do detector 1.8 Å; B) monoclinico crescido na presença de hexacianoferrato de potássio, imagem recolhida utilizando radiação produzida por um gerador de anódo rotativo, $\lambda=1.5418$ Å, no LMB, Universidade de Oxford, Inglaterra, resolução no extremo do detector 2.0 Å C) placa irregular crescido na presença de hexacianoferrato de potássio, imagem recolhida utilizando radiação produzida por um gerador de anódo rotativo, $\lambda=1.5418$ Å, no ITQB, UNL, Oeiras, resolução no extremo do detector 2.5 Å D) monoclinico crescido na presença de ascorbato de sódio, imagem recolhida utilizando radiação de sincrotrão, $\lambda=0.9091$ Å na estação X31, DESY, EMBL, Hamburgo, Alemanha, resolução no extremo do detector 1.7 Å. As imagens de difracção foram visualizadas com o programa XdisplayF do bloco de programas HKL.

A caracterização dos vários tipos de cristais e os parâmetros estatísticos obtidos no processamento dos seus dados de difracção está sumarizada na Tabela IIA.2.

Tabela IIA.2. Caracterização dos vários tipos de cristais e parâmetros estatísticos do processamento dos seus dados de difração.

Parâmetros	Tipos de cristais			ascorbato de sódio prisma triangular
	hexafluorato de potássio prisma triangular	hexafluorato de potássio placas irregulares	hexafluorato de potássio placas irregulares	
Crescidos na presença de	hexafluorato de potássio prisma triangular	hexafluorato de potássio placas irregulares	hexafluorato de potássio placas irregulares	ascorbato de sódio prisma triangular
Hábito cristalino	prisma triangular	prismas rectangulares	placas irregulares	prisma triangular
Grupo espacial	R32	C2	C2	R32
Dimensões da célula	$a=112.5 \text{ \AA}$, $c=63.2 \text{ \AA}$	$a=77.4 \text{ \AA}$, $b=80.3 \text{ \AA}$, $c=53.4 \text{ \AA}$ $\beta=97.5^\circ$	$a=77.2 \text{ \AA}$, $b=80.3 \text{ \AA}$, $c=53.5 \text{ \AA}$ $\beta=97.4^\circ$	$a=113.1 \text{ \AA}$, $c=63.0 \text{ \AA}$
Nº moléculas/unid. assim. (V_{sol} , %)	1 (55.0)	2 (58.5)	2 (58.6)	1 (55.0)
Intervalo total de resolução (Å)	20.0-1.9	40.0-2.15	2.5	30.0-2.0
[Intervalo de maior resolução] (Å)	[1.96-1.90]	[2.23-2.15]	[2.56-2.50]	[2.05-2.00]
Nº observações	25 678	58 102	76 627	136 213
Nº reflexões independentes	11 867	16 078	11 191	10 658
% dados recolhidos*	97.7 (96.3)	90.6 (92.6)	98.0 (92.8)	86.7 (99.5)
Redundância	2.2	2.6	3.4	5.7
$I/\sigma(I)$ *	8.8 (2.9)	11.2 (2.7)	16.0 (3.6)	28.9 (12.0)
$R_{sim} (\%)$ *#	4.5 (25.7)	8.7 (25.2)	8.7 (28.7)	4.8 (12.7)

*Os números entre parêntesis referem-se ao intervalo de maior resolução. $\#R_{sim} = \frac{\sum_h \sum_l |I_i(h) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_h \sum_l I_i(h)}$ onde $I_i(h)$ representa todas as observações equivalentes por simetria de uma mesma reflexão equivalente.

Os valores semelhantes determinados para as dimensões das células dos cristais monoclinicos, pertencentes ao mesmo grupo espacial (C2), sugerem que apesar dos seus hábitos cristalinos diferentes, correspondem à mesma forma cristalina. Em ambos os casos o cálculo da percentagem de solvente no cristal sugeriu a existência de duas (59 %) ou três (38 %) moléculas por unidade assimétrica. A análise da função de auto-rotação sugeriu que as moléculas na unidade assimétrica estão relacionadas por um eixo binário de rotação, o que está de acordo com a presença de duas moléculas na unidade assimétrica. Na figura IIA.10 está representado o estereograma para a secção $k=180^\circ$ da função de auto-rotação para cristais monoclinicos de desulfoferrodoxina. Um pico com uma altura superior a 6σ é repetidamente visível nesta secção na posição $\psi=50^\circ$ e $\phi=41^\circ$. Nas outras secções de k não foram encontrados outros máximos com intensidade significativa [57].

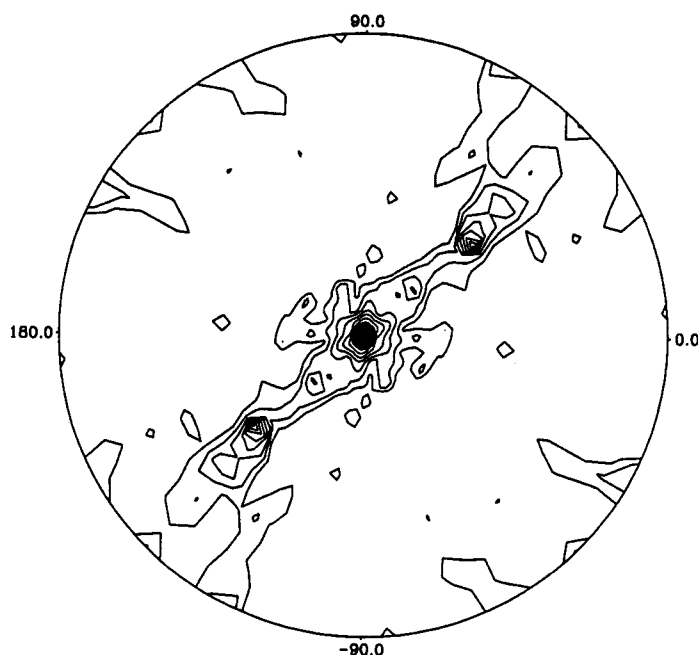


Figura IIA.10. Representação gráfica da solução característica da função de auto-rotação calculada para cristais monoclinicos de desulfoferrodoxina, secção $\kappa=180^\circ$. No cálculo da função de auto-rotação foi utilizado um raio de Patterson igual a 20 Å e um intervalo de resolução entre 20 e 3.5 Å. Os contornos estão representados em níveis de 1.0σ . O pico mais elevado (8.4σ) surge na posição $\psi=50.6^\circ$, $\phi=41.7^\circ$. O programa XPLOT84DRIVER (CCP4) [61] foi utilizado para traçar o gráfico.

A diferença entre as dimensões da malha dos cristais congelados e não congelados é inferior a 0.7 %. A percentagem de solvente presente nas duas formas cristalinas é semelhante.

4. Determinação das Fases

O cálculo da densidade electrónica carece do conhecimento do ângulo da fase para cada reflexão, no entanto esta grandeza não pode ser determinada directamente por via experimental. Vários métodos podem ser utilizados para uma determinação preliminar das fases: a) método de substituição isomórfica múltipla; b) método de substituição molecular usado quando é conhecida uma estrutura semelhante (modelo) à que se pretende determinar; c) método de dispersão anómala a múltiplos comprimentos de onda e; d) métodos directos que requerem a utilização de um conjunto de dados de difracção de alta resolução (cerca de 1.2 Å) e com elevada qualidade estatística para permitirem obter uma solução directa do problema da fase a partir das relações estatísticas existentes entre as intensidades das reflexões.

a) **Método de substituição isomórfica múltipla** (*MIR-Multiple isomorphous replacement*): a sua aplicação requer um conjunto de dados de difracção para um cristal da proteína nativa (P) e, pelo menos, para um cristal derivatizado por reacção da proteína com átomos de elementos com elevado número atómico (PH). A presença destes átomos deve ser a única responsável pelas diferenças de intensidade entre os dois padrões de difracção, isto é, as duas estruturas cristalinas devem ser isomórficas. Um isomorfismo perfeito implica que a conformação da proteína e as dimensões da

célula unitária se mantenham após o processo de derivatização. A função de Patterson calculada utilizando as diferenças entre as amplitudes dos factores de estrutura determinados para os dois conjuntos de dados, $|F_P|$ e $|F_{PH}|$, permite obter um mapa de vectores interatómicos entre os átomos pesados e determinar as suas posições na célula unitária, a partir das quais podem ser calculadas as amplitudes, $|F_H|$, e as fases, α_H , correspondentes à contribuição da presença dos átomos “pesados”. Os ângulos de fase para a proteína são determinados de modo que se verifique a soma vectorial $F_{PH} = F_P + F_H$.

b) **Método de substituição molecular:** Baseia-se na localização da posição das moléculas da proteína modelo na célula unitária do cristal. Para isso são geradas estruturas cristalinas com modelos moleculares colocados em diferentes posições seleccionando, posteriormente, as configurações que permitem obter uma correspondência razoável entre os factores de estrutura observados e os calculados para a estrutura da proteína modelo. Cada modelo molecular é tratado como um corpo rígido, sendo a sua posição na célula unitária definida relativamente a uma de referência por três parâmetros de rotação e três parâmetros de translação. A sua determinação é efectuada em dois passos consecutivos: os parâmetros de rotação são determinados em primeiro lugar através da função de rotação, depois do modelo molecular ter sido reorientado são determinados os parâmetros de translação a partir da função de translação.

A posição do modelo molecular, especificada pelos vectores atómicos u , é determinada pela rotação R e pela translação T , que movem o modelo da sua posição de referência no modelo, u^o , para a posição na estrutura a determinar,

$$u = Ru^o + T.$$

A função de rotação é calculada como a sobreposição de duas funções de Patterson, $P^{(obs)}$ e $P^{(calc)}$ que correspondem, respectivamente, à função calculada com os factores de estrutura observados e à função calculada com os factores de estrutura determinados para o modelo molecular

$$\mathbf{R}(\alpha, \beta, \gamma) = \int_{\Omega} P^{(obs)}(\mathbf{u}) P^{(calc)}[\mathbf{R}^{-1}\mathbf{u}] d\mathbf{u}$$

onde a região de integração Ω é usualmente uma zona esférica que inclui o máximo de vectores interatómicos intramoleculares e o mínimo de vectores interatómicos intermoleculares. A função de Patterson $P^{(calc)}[\mathbf{R}^{-1}\mathbf{u}]$ é obtida por aplicação da rotação (α, β, γ) à função de Patterson $P^{(calc)}(\mathbf{u})$. A função de rotação é usualmente parameterizada pelos ângulos de Euler que podem ser definidos como (α, β, γ) , onde α se refere a uma rotação em torno do eixo Z, seguida de uma rotação β em torno do eixo Y já reorientado e de uma rotação γ em torno do eixo Z reorientado.

A função de translação é usada para localizar o modelo orientado na célula unitária. É calculada a sobreposição da função de Patterson determinada a partir dos factores de estrutura observados, $P^{(obs)}$, e da função de Patterson obtida após aplicação da translação (x, y, z) à função de Patterson calculada a partir dos factores de estrutura determinados para o modelo orientado, $P^{(calc)}[\mathbf{T}^{-1}\mathbf{u}]$, no volume V da célula unitária

$$\mathbf{T}(x, y, z) = \int_V P^{(obs)}(\mathbf{u}) P^{(calc)}[\mathbf{T}^{-1}\mathbf{u}] d\mathbf{u}$$

A translação é expressa em termos de coordenadas fraccionais da célula unitária (x, y, z) .

Os parâmetros posicionais $(\alpha, \beta, \gamma, x, y, z)$ podem ser refinados utilizando o método de mínimos quadrados que permite maximizar a correlação entre as amplitudes dos factores de estrutura observados e calculados.

Dois parâmetros são vulgarmente usados para verificar a correspondência entre os factores de estrutura observados e calculados:

o factor R , definido como

$$R = \frac{\sum_{hkl} ||F_{obs}| - k|F_{calc}||}{\sum_h |F_{obs}|}$$

e o coeficiente de correlação,

$$C = \frac{\sum_{hkl} (|F_{obs}| - \langle |F_{obs}| \rangle) \times (|F_{calc}| - \langle |F_{calc}| \rangle)}{[\sum_{hkl} \langle (|F_{obs}| - \langle |F_{obs}| \rangle)^2 \rangle \sum_{hkl} \langle (|F_{calc}| - \langle |F_{calc}| \rangle)^2 \rangle]^{1/2}}$$

Este coeficiente tem relativamente ao factor R a vantagem de não ser dependente do factor de escala para as intensidades, k , isto é, a substituição de $|F_{obs}|$ por $k|F_{obs}| + \text{constante}$ permite obter o mesmo valor de C .

O sucesso do método de substituição molecular depende de vários factores, nomeadamente: a) qualidade e percentagem de dados de difracção recolhidos, b) homologia existente entre o modelo molecular e a estrutura molecular que se pretende determinar, c) tamanho do modelo molecular relativamente ao conteúdo da célula unitária e d) qualidade do critério usado como indicador da correspondência entre o modelo molecular e a estrutura determinar [63].

c) Método de dispersão anómala a múltiplos comprimentos de onda (MAD: *Multiwavelength anomalous dispersion*): é utilizado quando na molécula de proteína estão presentes dispersores anómalos intrínsecos ou adicionados, sendo as diferenças de Bijvoet existentes entre os pares de Friedel, $|F_{h(+)}|^2$ e $|F_{h(-)}|^2$, utilizadas para a determinação do ângulo de fase. A sua utilização relativamente à do método de substituição isomórfica múltipla tem a vantagem de todos os dados de difracção necessários poderem ser recolhidos de um único cristal, evitando-se os problemas decorrentes da existência de não isomorfismo entre cristais.

Para que a utilização deste método tenha sucesso é fundamental que as pequenas diferenças de intensidade entre os pares de Bijvoet e entre os dados de difracção recolhidos a diferentes comprimentos de onda (diferenças dispersivas) sejam maximizadas, o que implica que seja efectuada uma escolha adequada e precisa dos comprimentos de onda a utilizar e sejam minimizados os erros inerentes à recolha e processamento dos dados de difracção. Estes devem ser recolhidos a comprimentos de onda próximos do patamar de absorção do dispersor anómalo onde existem variações significativas nos componentes anómalos real, f' , e imaginário, f'' , do seu factor de dispersão anómala (geralmente denominadas $\Delta f'$ e $\Delta f''$). Além da componente anómala dependente do comprimento de onda, o factor de dispersão atómico, f , possui a componente denominada normal, f^p , independente do comprimento de onda, sendo $f = f^p + f' + f''$. A dispersão anómala está intimamente associada com a absorção ressonante de radiação X que ocorre quando a energia da radiação incidente se aproxima da energia associada a transições entre orbitais atómicos. Como a posição exacta do patamar de absorção depende do ambiente químico em torno do dispersor anómalo, o espectro de absorção da radiação X, medido por detecção de fluorescência, deve ser obtido utilizando um cristal. A partir deste espectro são determinados os valores de comprimento de onda a utilizar e as correspondentes posições do monocromador. O comprimento de onda a que é máximo o valor do coeficiente da absorção atómica corresponde ao máximo de f'' e permite obter as diferenças de Bijvoet máximas, o ponto de inflexão corresponde ao comprimento de onda a que é mínimo o valor de f' . São escolhidos mais um ou dois valores de comprimento de onda, denominados pontos remotos, de modo a maximizar as diferenças dispersivas.

Duas aproximações diferentes podem ser usadas para a determinação de estruturas utilizando o método de MAD. Inicialmente foi utilizado o formalismo algébrico desenvolvido por Hendrickson [64-66] a partir do trabalho de Karle [67]. Todos os dados de difracção são usados na determinação da componente normal do factor de estrutura do dispersor anómalo, F_A , da componente normal do factor de estrutura de todos os átomos, F_T , e da diferença de fase entre os factores de estrutura para a estrutura total (ϕ_T) e do dispersor anómalo (ϕ_A), $\Delta\phi$. Este procedimento não requer que sejam conhecidas as posições dos dispersores anómalos, porém exige uma estimativa inicial de f' e f'' para cada comprimento de onda. As amplitudes de F_A são usadas para a determinação das posições ocupadas pelos dispersores anómalos por interpretação do mapa de Patterson, sendo posteriormente refinadas as suas posições, ocupações e parâmetros de vibração térmica de modo a ajustarem-se aos valores de F_A . A fase calculada, ϕ_A , e a diferenças de fases, $\Delta\phi$, são então utilizadas para calcular a fase ϕ_T .

Tendo em que conta que os aspectos físicos subjacentes aos métodos MAD e MIR são semelhantes, foi proposta a determinação de estruturas utilizando MAD como um caso particular de MIR [68]. Na realidade, em ambos os métodos é provocada uma alteração do poder de dispersão em algumas zonas específicas da célula unitária, quer devido à introdução de átomos “pesados” em posições específicas (MIR) quer alterando as propriedades de dispersão de átomos já existentes na estrutura através da variação do comprimento de onda da radiação-X usada para recolher os dados de difracção (MAD). Nesta aproximação, os dados de difracção recolhidos a um dos comprimentos de onda são utilizados como “nativo” e os outros conjuntos de dados considerados como “derivados”. É vantajoso que o “nativo” seja o conjunto de dados

a que corresponde o valor máximo ou mínimo de f' , de modo que as maiores diferenças dispersivas sejam utilizadas directamente no procedimento de determinação da fase.

4.1. Materiais e Métodos

Os cristais romboédricos crescidos na presença de hexacianoferrato de potássio foram utilizados para os vários ensaios experimentais efectuados com o objectivo de resolver o problema da fase. Esta escolha foi determinada pelo facto desta forma cristalina surgir com maior reprodutibilidade e para a qual foi obtido um conjunto de dados de difracção de maior resolução.

Uma pesquisa efectuado com o programa BLITZ [69] na base de dados de sequências de proteínas SWISS-PROT permitiu verificar que a desulfoferrodoxina isolada de *D. d.* apresentava homologia significativa apenas com as sequência da desulfoferrodoxina de *D. v.* e da desulforedoxina de *D. g.* A estrutura tridimensional de ambas as proteínas não tinha sido ainda determinada. Por isso, recorreu-se ao método de substituição isomórfica múltipla [70] para obtenção de informação sobre as fases. A má qualidade dos resultados obtidos e o facto de, entretanto, ter sido determinada a estrutura da desulforedoxina isolada de *D. g.* [71] sugeriu a utilização em alternativa do método de substituição molecular [72]. Os resultados obtidos não permitiram também a resolução da estrutura. Recorreu-se então ao método de dispersão anómala a múltiplos comprimentos de onda [73] utilizando como dispersores anómalos os átomos de ferro constituintes da proteína. Os dados de difracção obtidos permitiram

determinar as suas posições, resolver o problema da fase e determinar a estrutura da desulfoferrodoxina.

4.1.1. Método de Substituição Isomórfica Múltipla

Os ensaios a seguir descritos foram efectuados no Laboratório de Biofísica Molecular, Universidade de Oxford, Reino Unido.

Para a preparação dos cristais de desulfoferrodoxina derivatizados com átomos pesados procedeu-se à adição de compostos contendo átomos de elevado número atómico à solução de cristalização. O tempo de contacto com o cristal, assim com a concentração do composto utilizado, foram gradualmente ajustados de modo a não ocorrer uma perda significativa da qualidade do seu padrão de difracção após a “reacção” de derivatização. A optimização das condições de derivatização envolveu ainda a utilização de vários compostos contendo átomos “pesados” escolhidos de acordo com a sua reactividade para as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos [74] presentes na proteína e a composição da solução de cristalização. Nos casos em que o composto apresentou baixa solubilidade ao pH da solução de cristalização (7.5), efectuaram-se ensaios preliminares para verificar a estabilidade dos cristais a um pH mais favorável.

Depois de sujeitos ao processo de derivatização os cristais foram colocados em capilares de vidro, como já anterior referido em II.A.3.1., e testada a qualidade do seu padrão de difracção. As imagens de difracção foram recolhidas utilizando um detector de superfície multifio Xentronics e radiação monocromática Cu-K α produzida por um gerador de anôdo rotativo Rigaku RU200H funcionando a uma potência máxima de 4.2 kW. Quando a intensidade do padrão de difracção era significativa relativamente

ao ruído de fundo procedeu-se à recolha de um conjunto de dados de difracção. O seu processamento foi efectuado com o bloco de programas XDS [75, 76] que recorre ao método de análise de perfis para determinar as intensidade das manchas de difracção, aplica correcções para os efeitos de Lorentz e de polarização e indexa as reflexões.

O gás nobre xenon foi também utilizado como agente de derivação. O cristal a ser derivatizado foi colocado dentro de um capilar de quartzo posteriormente cheio com xenon a uma pressão de 12 bar. O sistema de pressurização utilizado é o descrito em [77]. Foram recolhidos dados de difracção utilizando um detector MarResearch e radiação de sincrotrão no LURE, Universidade de Paris Sul, França. O processamento dos dados de difracção foi efectuado com o bloco de programas MOSFLM [75, 76].

Em ambos os casos, as intensidade individuais para cada conjunto de dados foram convertidas numa mesma escala, combinadas e analisadas estatisticamente com os programas ROTAVATA, AGROVATA e TRUNCATE do bloco CCP4 [61]. As intensidades indexadas para o cristal derivatizado e para o cristal nativo foram comparadas estatisticamente após colocadas na mesma escala pelo programa SCALEIT [61]. Como referência foi utilizado o conjunto de dados recolhidos no Laboratório de Daresbury para um cristal romboédrico crescido na presença de hexacianoferrato de potássio até a resolução de 1.9 Å (ver subcapítulo II.A.3.2.). Os mapas de diferença de Patterson entre os dois conjuntos de dados de difracção foram calculados utilizando o programa FFT [61] e posteriormente interpretados para determinação das posições dos átomos “pesados”.

4.1.2. Método de Substituição Molecular

Os cálculos foram efectuados com o bloco de programas AMORE [79, 78] utilizando as intensidades recolhidas no Laboratório de Daresbury para um cristal romboédrico crescido na presença de hexacianoferrato de potássio até a resolução de 1.9 Å (ver subcapítulo II.A.3.2.) e, como modelo, as coordenadas do monómero da desulforredoxina de *D. g.*. A sequência primária da desulforredoxina apresenta uma identidade de 53% com os 36 resíduos constituintes do N-terminal da cadeia polipeptídica.

4.1.3 Método de Dispersão Anómala a Múltiplos Comprimentos de Onda [80]

Os dados de difracção contendo informação sobre a contribuição da dispersão anómala dos átomos de ferro foram recolhidos a quatro comprimentos de onda diferentes da radiação X usando um detector MarResearch na estação BM-14 do European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, França. Foi utilizado um único cristal congelado para evitar perda de qualidade estatística dos dados de difracção como consequência da combinação de dados obtidos a partir de vários cristais. Devido ao fraco sinal de dispersão anómala é fundamental minimizar os erros sistemáticos e alcançar-se uma elevada precisão na determinação das intensidades. Este é o objectivo que mais fortemente condiciona a escolha da estratégia a utilizar para a recolha de dados de difracção.

A escolha dos comprimentos de onda da radiação-X a utilizar na recolha de dados foi efectuada a partir do espectro de fluorescência de raio-X obtido para um cristal de desulfoferrodoxina perto do extremo de absorção da camada K do ferro (ver figura

IIA.11). Foram escolhidos os comprimentos de onda que permitem maximizar a contribuição anômala do ferro: o máximo de fluorescência ($\lambda_1=1.7417 \text{ \AA}$, máximo em f''), o ponto de inflexão ($\lambda_2=1.7428 \text{ \AA}$, o mínimo de f'), e dois pontos afastados do patamar de absorção à esquerda e à direita dos anteriores ($\lambda_3=1.7517 \text{ \AA}$ e $\lambda_4=1.0895$

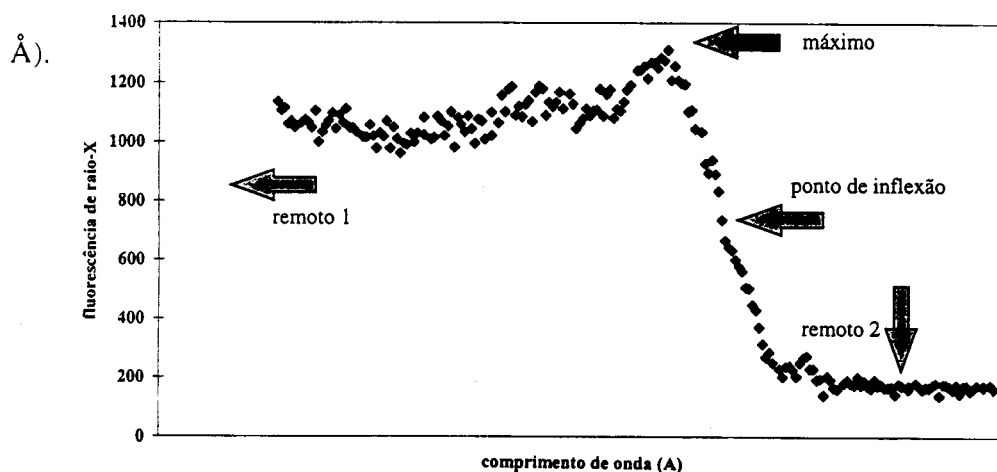


Figura IIA.11. Espectro de fluorescência de raio-X obtido para um cristal romboédrico de desulfoferrodoxina crescido na presença de ferricianeto de potássio na região do extremo de absorção correspondente à camada K do ferro. Estão assinalados os valores de comprimento de onda seleccionados para a recolha dos dados de difracção, nomeadamente, $\lambda_1=1.7417 \text{ \AA}$, máximo de f'' , $\lambda_2=1.7430 \text{ \AA}$, mínimo de f' , e os pontos remotos $\lambda_3=1.7514 \text{ \AA}$ e $\lambda_4=1.0908 \text{ \AA}$.

Os primeiros cristais utilizados foram alinhados com o eixo c aproximadamente paralelo ao eixo de oscilação e a geometria de feixe inverso foi utilizada para a recolha de dados de difracção, de modo a registar os pares de Bijvoet em imagens próximas. A necessidade de recorrer à geometria de feixe inverso para a recolha dos dados de difracção prende-se com o facto de não existir, neste grupo espacial, um eixo de simetria perpendicular ao eixo c . A estatística para os dados processados era má, provavelmente devido ao elevado ruído provocado pelos anéis de difracção do gelo. Posteriormente um cristal de menores dimensões foi alinhado com o eixo c aproximadamente a 90° do eixo de oscilação, utilizando um laço para a congelação do cristal de diâmetro inferior relativamente ao utilizado nos ensaios anteriores. A presença de uma menor quantidade de solvente em torno do cristal permitiu obter uma

intensidade significativamente menor para os anéis de difracção, diminuindo o ruído de fundo. Os pares de Bijvoet foram registados em imagens próximas evitando assim recorrer-se à geometria de feixe inverso para a recolha de dados de difracção.

Foram recolhidas sequencialmente cinco imagens de difracção para cada comprimento de onda alternando sucessivamente os comprimentos de onda de valores mais próximos do patamar de absorção, λ_1 , λ_2 e λ_3 . O detector foi colocado a uma distância de 120 mm do cristal. A cada imagem correspondeu uma exposição de 40 segundos e uma rotação de 2° perfazendo um total de 80° para o conjunto de dados recolhidos. Posteriormente recolheram-se 40 imagens de difracção com uma rotação de 2° e uma exposição de 20 segundos por imagem utilizando radiação X com comprimento de onda de 1.0895 \AA (λ_4) e uma distância cristal-detector de 175 mm.

As imagens de difracção obtidas para cada comprimento de onda foram processadas com já descrito no subcapítulo II.A.3.1. As intensidades indexadas para as imagens recolhidas para λ_1 , λ_2 e λ_3 foram comparadas estatisticamente com as intensidades recolhidas para λ_4 após colocadas na mesma escala. Os cálculos foram efectuados pelo programa SCALEIT [61]. As posições dos átomos de ferro foram determinadas a partir do mapas de Patterson calculados utilizando como coeficientes as diferenças anómalas do conjunto de dados com maior sinal anómalo (λ_1) e confirmadas a partir de mapas de Patterson calculados usando como coeficientes as diferenças anómalas para os dados recolhidos a λ_2 , assim como as máximas diferenças dispersivas esperadas ($||F(\lambda_2)| - |F(\lambda_4)||^2$). As posições dos dois átomos de ferro foram determinadas com o programa RSPS [61] e confirmadas pelo programa SHELXS-86 [79].

O refinamento dos parâmetros atômicos dos átomos de ferro e o posterior cálculo da fase para cada reflexão foi efectuado com o programa MLPHARE [61]. Os dados recolhidos a λ_2 foram usados como referência, tendo em conta o seu sinal anómalo intrínseco, e comparados com os dados recolhidos aos outros três comprimentos de onda, de acordo com o procedimento proposto por Ramakrishnan *et al* [81] e por Glover *et al* [82]. As fases preliminares foram determinadas usando os dados no intervalo de resolução de 10 a 2.8 Å. O programa DM [61] foi usado para otimizar o mapa de densidade electrónica obtido, incluindo procedimentos para nivelamento do solvente e de correspondência de histograma de densidade electrónica (*histogram matching*), e estender as fases calculadas até à resolução de 2.5 Å.

A estratégia utilizada para a recolha de dados permitiu minimizar os erros sistemáticos sendo trivial a determinação e a aplicação do factor de escala entre os quatro conjuntos de dados.

4.2. Resultados

4.2.1. Método de Substituição Isomórfica Múltipla

A tabela IIA.3 resume os resultados obtidos para as experiências de optimização das condições de derivatização dos cristais de desulfoferrodoxina. Os valores dos parâmetros estatísticos para o processamento dos dados de difracção recolhidos estão sumarizados na tabela IIA.4. Em nenhuma das condições de derivatização se verificou uma diferença significativa nas dimensões da célula unitária relativamente ao cristal nativo.

Tabela IIA.3. Resultados obtidos para as experiências de otimização das condições de derivatização dos cristais de desulfoferrodoxina.

Composto	Concentração(mM)	Tempo de contacto (horas)	Observações
PCMBS	15	13	recolhidos dados de difracção
	10	29	recolhidos dados de difracção
Acetato de mercúrio (II)	10	8	intensidade padrão difracção fraca
	1	2	intensidade padrão difracção fraca
	1	1	intensidade padrão difracção fraca
	1	1	recolhidos dados de difracção
	1	0.5	recolhidos dados de difracção
	0.1	2	recolhidos dados de difracção
Ácido Mersalfílico	0.01	1	recolhidos dados de difracção
	1	2.5	intensidade padrão difracção fraca
	1	1	recolhidos dados de difracção
Fosfato de etil mercúrio	10	2.5	intensidade padrão difracção fraca
	1	18	intensidade padrão difracção fraca
Glioxal de fenil mercúrio (II)	1	2	intensidade padrão difracção fraca
	1	2	intensidade padrão difracção fraca
	1	0.5	intensidade padrão difracção fraca
	10	15	intensidade padrão difracção fraca
Acetato de uranilo	1	8	intensidade padrão difracção fraca
	2.5	2	intensidade padrão difracção fraca
Nitrato de uranilo	2.5	1.25	intensidade padrão difracção fraca
	2.5	1	recolhidos dados de difracção
	2.5	0.5	intensidade padrão difracção fraca
	1	3	recolhidos dados de difracção
	1	1.5	recolhidos dados de difracção

Continuação Tabela IIA.3.

Composto	Concentração(mM)	Tempo de contacto (horas)	Observações
Nitrato de urânio	1	1	intensidade padrão difracção fraca
	1	0.5	intensidade padrão difracção fraca
	0.1	1	recolhidos dados de difracção
Acetato de trimetil chumbo (IV)	40	29	intensidade padrão difracção fraca
	40	20	recolhidos dados de difracção
	40	16	recolhidos dados de difracção
	10	32	intensidade padrão difracção fraca
	10	16	intensidade padrão difracção fraca
	10	13	recolhidos dados de difracção
Acetato de chumbo	10	3	recolhidos dados de difracção
	10	21	recolhidos dados de difracção
	10	18	intensidade padrão difracção fraca
Tetracloroplatinato de potássio	1	16	intensidade padrão difracção fraca
	1	5	intensidade padrão difracção fraca
	1	3	intensidade padrão difracção fraca
	1	1	recolhidos dados de difracção
	10	25	intensidade padrão difracção fraca
Tetracianoplatinato de potássio	5	2.5	intensidade padrão difracção fraca
	1	18	recolhidos dados de difracção
	10	25	intensidade padrão difracção fraca
Tetracloroaureato de sódio	5	18	intensidade padrão difracção fraca
	10	25	intensidade padrão difracção fraca
Acetato de samário (III)	10	25	intensidade padrão difracção fraca
	10	21	recolhidos dados de difracção
	10	17.5	recolhidos dados de difracção

Tabela IIA.4. Estatística para o processamento dos dados de difração recolhidos para cristais sujeitos ao processo de derivatização.

Condições de derivatização	Resolução	I/σ(I)*	% dados	R _{sim} (I)*#	R _{scale} (F)†
PCMBs, 15mM, 13h	3.0	11.0 (9.7)	33.3 (18.6)	0.078 (0.115)	0.126
PCMBs, 10 mM, 29h	2.9	7.0 (1.9)	83.1 (42.9)	0.094 (0.353)	0.142
Acetato de mercúrio (II), 1mM, 1h	2.9	4.2 (1.0)	37.8 (12.0)	0.176 (0.100)	0.262
Acetato de mercúrio (II), 1 mM, 0.5h	3.0	3.5 (1.7)	85.8 (59.8)	0.173 (0.395)	0.218
Acetato de mercúrio (II), 0.1mM, 2h	2.9	25.7 (13.7)	33.1 (7.7)	0.031 (0.072)	0.068
Acetato de mercúrio (II), 0.001mM, 1h	2.9	8.2 (1.7)	92.0 (33.8)	0.082 (0.370)	0.089
Ácido mersalílico, 1mM, 1h	3.0	26.0 (2.2)	44.4 (30.2)	0.034 (0.384)	0.145
Nitrato de urânio, 2.5mM, 1h	3.0	6.8 (2.6)	32.7 (19.7)	0.091 (0.278)	0.133
Nitrato de urânio, 1mM, 3h	2.9	9.5 (2.9)	82.8 (45.2)	0.073 (0.278)	0.089
Nitrato de urânio, 1mM, 1.5h	2.9	8.7 (1.6)	84.3 (25.2)	0.081 (0.400)	0.105
Nitrato de urânio, 0.1 mM, 1h	2.9	12.0 (7.4)	78.3 (26.8)	0.058 (0.111)	0.083
Acetato de trimetil chumbo, 40mM, 20h	3.0	1.8 (1.5)	72.7 (48.9)	0.354 (0.491)	0.495
Acetato de trimetil chumbo, 40mM, 16h	3.0	8.1 (3.4)	35.9 (34.1)	0.096 (0.217)	0.241
Acetato de trimetil chumbo, 10mM, 13h	3.0	10.4 (4.0)	66.1 (55.9)	0.067 (0.198)	0.108
Acetato de trimetil chumbo, 10mM, 3h	2.9	6.4 (2.8)	87.7 (31.0)	0.103 (0.261)	0.112
Acetato de chumbo, 10mM, 21h	2.9	7.4 (1.4)	94.6 (45.7)	0.089 (0.459)	0.127
Tetracloroplatinato de potássio, 1mM, 1h	3.0	7.7 (1.7)	91.8 (70.0)	0.086 (0.420)	0.174
Tetracianoplatinato de potássio, 1mM, 18h	3.0	11.5 (3.5)	31.5 (16.2)	0.056 (0.170)	0.071
Acetato de samário (III), 10mM, 21h	3.0	9.0 (8.29)	21.5 (33.1)	0.078 (0.101)	0.121
Acetato de samário (III), 10mM, 17.5h	2.9	8.9 (4.3)	83.5 (19.0)	0.080 (0.176)	0.116
Xenon, 12 bar	2.9	5.2 (1.9)	95.3 (69.2)	0.114 (0.319)	0.146

*Os números entre parêntesis referem-se ao intervalo de maior resolução. #R_{sim}= $\sum_{h} \sum_{l} |I_i(h) - \langle I_i(h) \rangle| / \sum_{h} \sum_{l} I_i(h)$ onde $I_i(h)$ é a inésima medida. †R_{scale}= $\sum_{h} \sum_{l} |F_i(d) - |F_i(n)|| / \sum_{h} |F_i(d)|$, onde F(d) e F(n) são respectivamente os factores de estrutura para o cristal derivatizado e para o cristal nativo.

Os resultados obtidos sugerem que o poder de difracção do cristal era destruído na presença de concentrações mais elevadas do composto utilizado para a derivatização ou de tempos de contacto mais longos. A redução destes factores para valores em que o cristal mantivesse um padrão de difracção com uma intensidade razoável originou nalgumas condições conjuntos de dados semelhantes aos nativos, como pôde ser verificado após a análise dos mapas de diferença de Patterson, o que sugere a inexistência de reacção de derivatização nessas condições. Noutras condições, não foi possível determinar as posições dos átomos pesados por interpretação das posições dos máximos presentes nos mapas de diferença de Patterson.

4.2.2. Método de Substituição Molecular

Os coeficientes de correlação para os máximos calculados pela função de rotação têm valores baixos (inferiores a 15 %) não existindo diferenças significativas entre eles. Os ângulos de rotação a que correspondiam picos mais intensos no mapa de Patterson foram utilizados para o cálculo da função de translação. Para o pico mais intenso foi obtido um coeficiente de correlação de 18% e um factor R de 53%. O refinamento de corpo rígido efectuado não melhorou os valores de ambos os parâmetros estatísticos.

4.2.3. Método de Dispersão Anómala a Múltiplos Comprimentos de Onda [80]

Os valores dos parâmetros estatísticos para o processamento dos dados de difracção recolhidos aos comprimentos de onda λ_1 , λ_2 , λ_3 e λ_4 , e para a comparação entre as intensidades obtidas a λ_1 , λ_2 e λ_3 e as obtidas a λ_4 estão resumidas na Tabela IIA.5.

Tabela IIA.5. Estatística para o processamento dos dados de difração recolhidos a quatro comprimentos de onda.

Comprimentos de onda (Å)	Intervalo de resolução (Å)	Nº observações [Nº reflexões]	%dados recolhidos * [Multiplicidade]	Nº pares de Bijvoet [%dados recolhidos]	I/σ(I)*	R _{sim} (%)*# R _{anom} (%)*‡	R _{disp} (%)*†
1.7514 (λ ₃) (remoto 1)	40.0-2.80	18405 [3856]	98.9(96.1) [4.8]	3448 [96.0]	14.3 (11.4)	3.5(5.9) 2.0 (3.2)	4.4 (5.5)
1.7430 (λ ₂) (inflexão)	40.0-2.80	16774 [3876]	99.4(100) [4.3]	3413 [85.7]	14.6 (11.2)	3.5(6.0) 3.6 (4.6)	5.3 (6.5)
1.7417 (λ ₁) (máximo)	40.0-2.75	19163 [4059]	98.7(95.1) [4.7]	3614 [98.7]	14.1 (7.7)	3.6(8.2) 4.1 (6.3)	3.9 (5.1)
1.0908 (λ ₄) (remoto 2)	40.0-2.50	24873 [5230]	96.3(87.5) [4.8]	4608 [91.3]	22.9 (10.1)	2.6(7.4) 2.1 (4.8)	-

*Os números entre parênteses referem-se ao intervalo de maior resolução; Entre parênteses rectos estão representados os valores para a grandeza referida; # $R_{sim} = \sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i I_i(h)$ onde $I_i(h)$ é a inésima medida, † $R_{anom} = \sum |<I+> - <I->| / \sum |<I+> + <I->|$, ‡ $R_{disp} = \sum |F_p(\lambda_a) - |F_p(\lambda_a)|| / \sum |F_p(\lambda_a)|$ onde $F_p(\lambda_a)$ e $F_p(\lambda_a)$ são os factores de estrutura para a proteína a λ_a ($a=1,2,3$)

Na figura II.A.12 são apresentadas as secções de Harker ($z=0$, $z=1/3$ e $z=2/3$) para os mapas de Patterson calculados usando como coeficientes as diferenças anómalas medidas ao comprimento de onda λ_1 e as diferenças dispersivas entre as intensidades medidas a λ_2 e a λ_4 . Os mapas de Patterson calculados nestas duas condições são semelhantes ao obtido a partir das diferenças anómalas ao comprimento de onda λ_2 . A análise dos mapas de Patterson foi efectuada com o programa RSPS [61] e permitiu determinar as posições dos dois átomos de ferro presentes na unidade assimétrica. Estes valores, assim como a posição e a intensidade dos vectores de Harker correspondentes são apresentados na Tabela II.A.6.

As posições determinadas para os dois átomos de ferro utilizando o programa SHELXS-86 [79] permitiram obter vectores interatómicos coincidentes com os representados na figura II.A.12.

Os valores dos parâmetros estatísticos para o cálculo e refinamento das fases efectuado com o programa MLPHARE [61] são apresentados na tabela II.A.7. O refinamento convergiu com um valor de figura de mérito de 0.69. Este valor aumentou para 0.78 após ser efectuado o nivelamento de solvente, *histogram matching* e a extensão das fases a 2.5 Å. A figura II.A.13 mostra os mapas de densidade electrónica antes e após a aplicação do processo de optimização. É notório o aumento do contraste entre a densidade para a proteína e para as regiões de solvente. A qualidade do mapa de densidade electrónica calculado a 2.5 Å usando as fases optimizadas foi suficiente para construir 94 % do modelo da proteína.

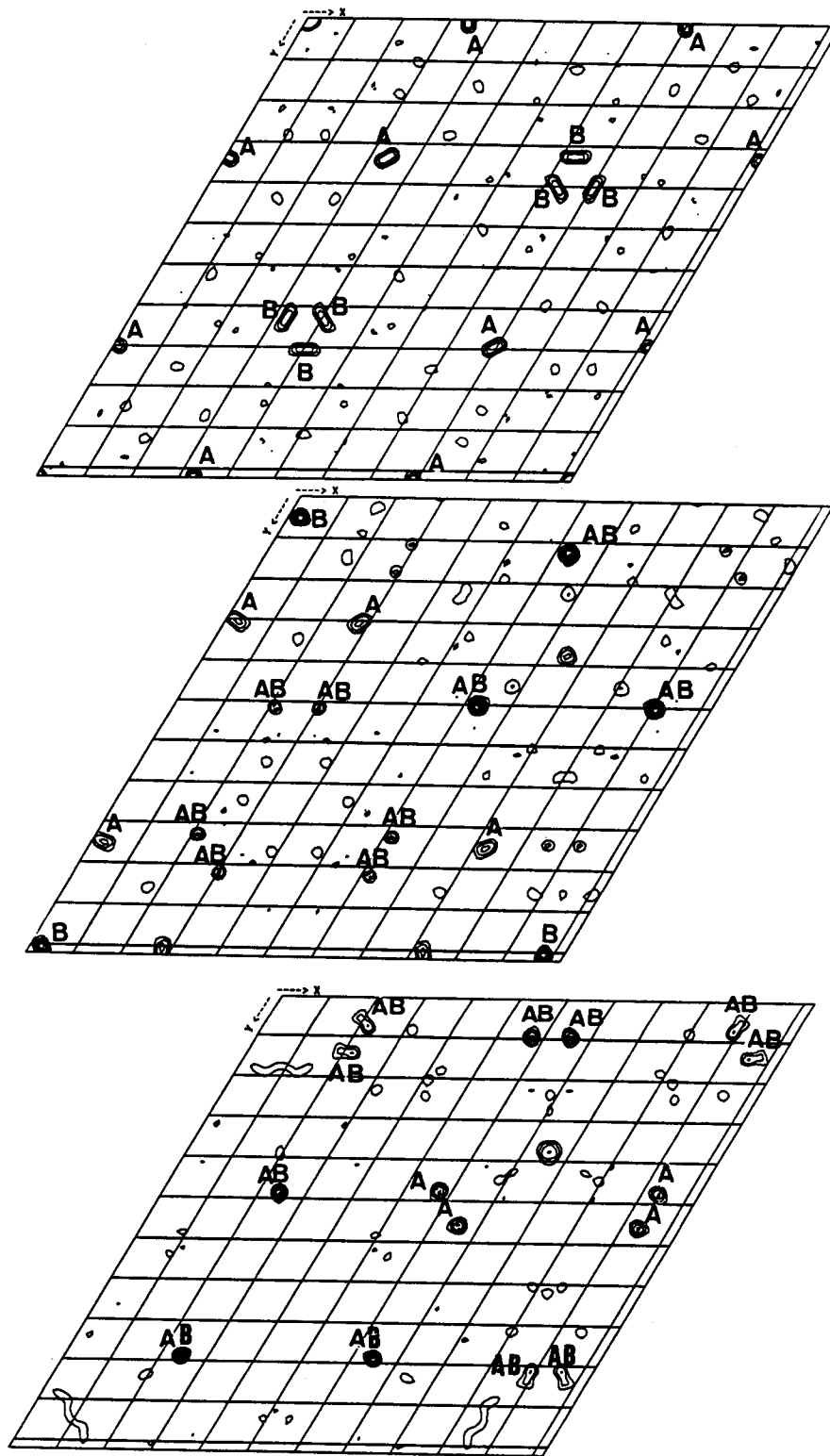


Figura IIA.12A. Mapas de Patterson calculados utilizando como coeficientes as diferenças anômalas para os dados recolhidos a λ_1 . Os vetores para as secções de Harker $z=0$, $z=1/3$ e $z=2/3$, correspondentes às posições dos átomos de ferro 1 e 2 estão identificadas com as letras A e B, respectivamente. Os vetores de Harker cruzados estão identificados com AB. Os contornos estão representados a intervalos de 1σ começando a 1.5 unidades de σ . Os programas NPO e XPLOT84DRIVER (CCP4) [61] foram utilizados para traçar os gráficos.

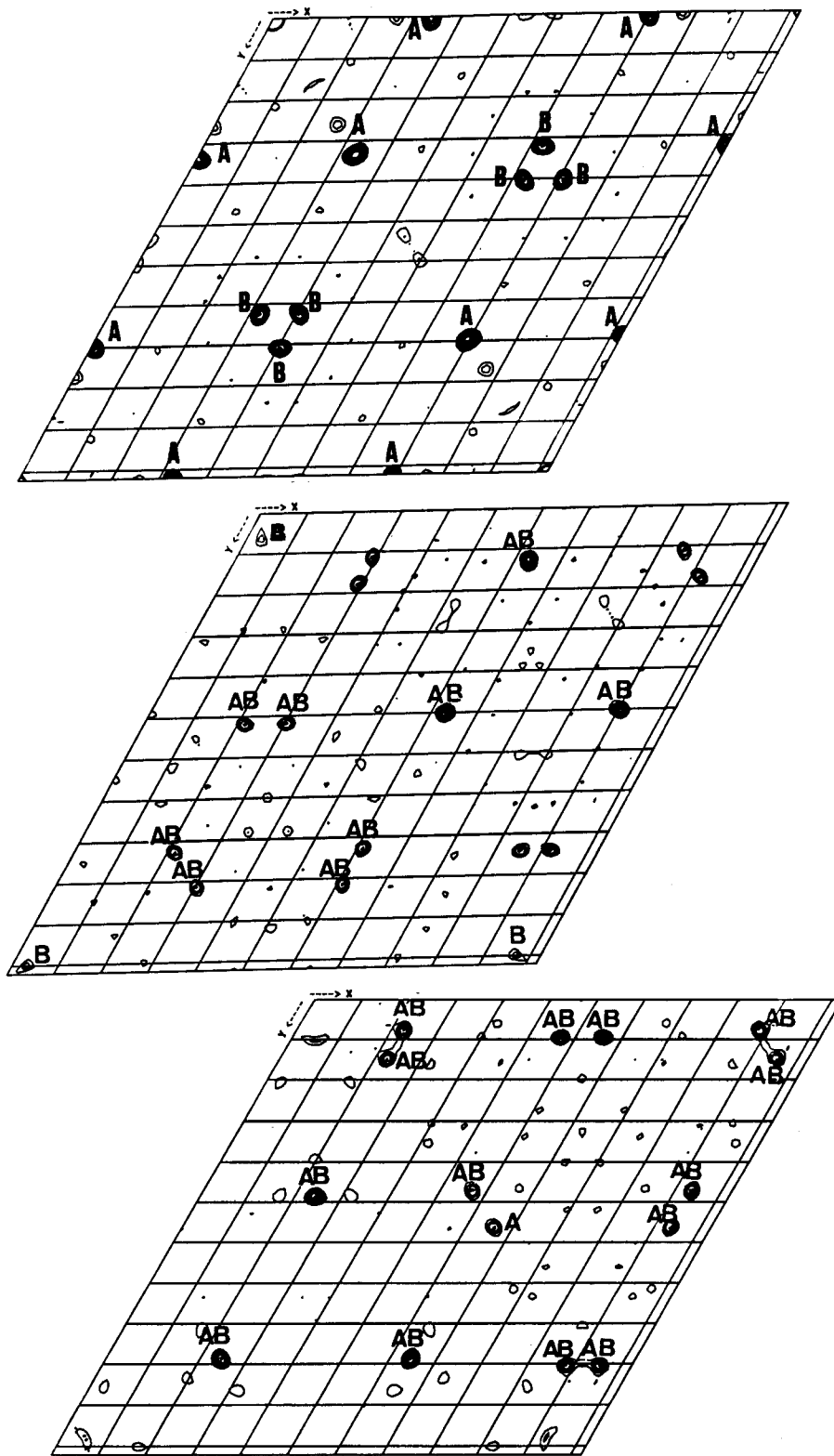


Figura IIA.12B. Mapas de Patterson calculados utilizando como coeficientes as máximas diferenças dispersivas esperadas ($||F(\lambda_2)| - |F(\lambda_4)||^2$). Os vetores para as secções de Harker $z=0$, $z=1/3$ e $z=2/3$, correspondentes às posições dos átomos de ferro 1 e 2 estão identificadas com as letras A e B, respectivamente. Os vetores de Harker cruzados estão identificados com AB. Os contornos estão representados a intervalos de 1σ começando a 1.5 unidades de σ . Os programas NPO e XPLOT84DRIVER (CCP4) [61] foram utilizados para traçar os gráficos.

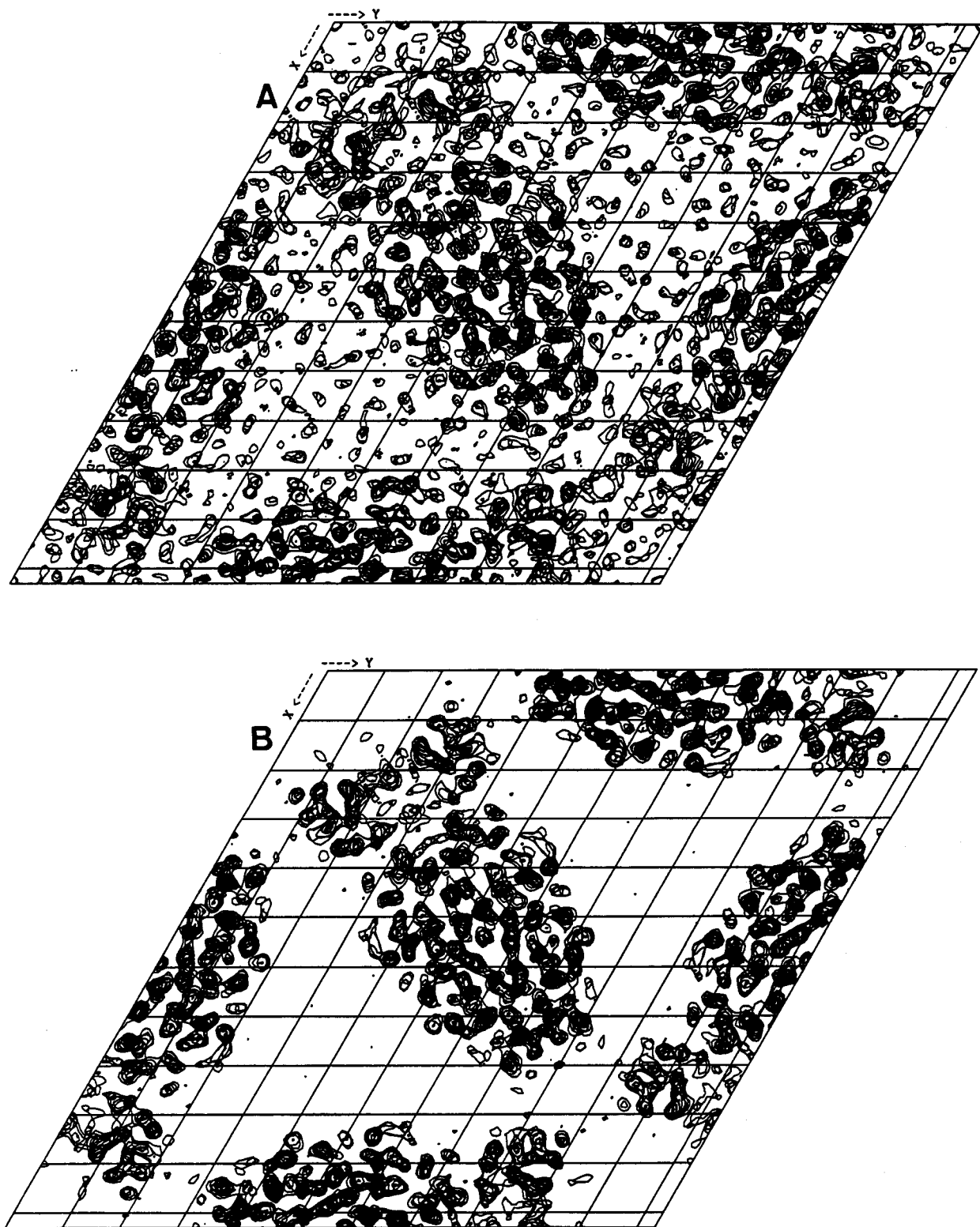


Figura IIA.13 A) e B) Mapas de densidade electrónica calculados utilizando, respectivamente as fases antes e após a optimização da densidade. Os contornos estão representados a intervalos de 1σ começando a 1 unidade de σ . Os programas NPO e XPLOT84DRIVER (CCP4) [61] foram utilizados para traçar os gráficos.

5. Construção do Modelo e Refinamento da Forma Cristalina Romboédrica

Após serem conhecidos os valores das amplitudes dos factores de estrutura e de ter sido obtida uma determinação aproximada das fases pode ser calculado o mapa de densidade electrónica. Com base neste mapa e considerando que aos seus máximos correspondem posições atómicas é construído um modelo estrutural inicial. O conhecimento da estrutura primária da proteína é uma ajuda importante nesta fase do processo, nomeadamente quando a resolução máxima obtida para os dados de difracção não é elevada.

Após ter sido determinada a posição aproximada da maioria dos átomos pode ser iniciado o refinamento da estrutura, durante o qual os parâmetros atómicos (as coordenadas de posição e um parâmetro de vibração térmica isotrópica) são variados sistematicamente de modo a conseguir-se alcançar a melhor correlação entre as amplitudes observadas para os factores de estrutura com as calculadas para a estrutura proposta. O factor R , $\frac{\sum_{hkl} ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum_{hkl} |F_{obs}|}$, é utilizado como índice de concordância entre as duas grandezas. No entanto, verificou-se que, nalguns casos, valores baixos do factor R correspondiam a estruturas refinadas incorrectas, nomeadamente devido ao elevado número de parâmetros do modelo utilizados. Foi então, sugerida a utilização do factor R -free [83] que não é afectado pelo processo de refinamento, uma vez que embora calculado do mesmo modo que o factor R utiliza apenas os factores de estrutura de um conjunto de reflexões não utilizadas no processo de refinamento.

É comum efectuar-se o processo de refinamento recorrendo ao método dos mínimos quadrados quando se pretende encontrar o melhor ajuste de um modelo estrutural a um conjunto de dados experimentais e, é maior o número destes dados que de

parâmetros a determinar. Os melhores parâmetros para o modelo são obtidos minimizando a soma dos quadrados dos desvios entre as quantidades experimentais e os valores das mesmas quantidades calculados com os parâmetros deduzidos. Deve ser atribuído um maior peso às grandezas a que à partida se sabe corresponder uma maior exactidão. A validade das suposições em que assenta este método implica que o modelo esteja já bastante próximo da estrutura correcta, sob o risco do processo convergir para um falso mínimo a que não corresponde a correcta solução do problema, podendo também por vezes não convergir.

É desejável introduzir restrições às variações dos vários parâmetros atómicos de modo a satisfazerem-se determinados critérios específicos, usualmente de carácter estereoquímico. Isto permite diminuir o número de parâmetros a refinar acelerando o processo e, tem em conta o facto de na maioria dos casos o refinamento estrutural de uma macromolécula se iniciar a uma resolução longe da resolução atómica. No algoritmo estabelecido por Hendrickson e Konnert [84, 85] e utilizado pelo programa SHELXL [86, 87] são usadas várias restrições estereoquímicas, nomeadamente relativas a distâncias e ângulos de ligação, planaridade de alguns átomos relativamente a certos grupos, configuração de centros quirais, ângulos de torsão e interações não-covalentes. A função que é minimizada durante o processo de refinamento inclui o termo cristalográfico e os vários termos estereoquímicos.

No algoritmo de Powell [88] utilizado pelo programa XPLOR [89] para execução do denominado refinado positional, as restrições estereoquímicas são contabilizadas como termos energéticos. A função de energia calculada (E_{total}) é minimizada usando todas as coordenadas atómicas como variáveis e pode ser subdividida em dois termos, sendo, $E_{total} = E_{empírica} + E_{efectiva}$, onde a $E_{empírica}$ descreve a energia da molécula

através de uma função de energia empírica que tem em conta as energias correspondentes às restrições estereoquímicas e às interações não covalentes (energias de van der Waals, de ligações de hidrogénio e electrostática) e de ligações covalentes e a E_{efectiva} inclui os termos de energia que contemplam restrições relativas a informação experimental ou outra, nomeadamente relativas a parâmetros cristalográficos, aplicadas a coordenadas atómicas, a ângulos dihedros e a simetria não cristalográfica.

O programa XPLOR [89] permite ainda efectuar refinamento por dinâmica molecular, método em que é simulado o comportamento dinâmico de um sistema de partículas, com a obtenção de um conjunto de estruturas energeticamente permitidas para determinadas condições de temperatura e pressão. A distribuição das estruturas dentro do conjunto segue a lei de Boltzmann. Para temperaturas mais elevadas é maior o número de átomos com maior velocidade e, conseqüentemente com maior energia cinética, podendo ultrapassar maiores barreiras energéticas e corrigir erros maiores na estrutura. O método de “têmpera simulada” (*simulated annealing*) utiliza este procedimento começando por aplicar temperaturas crescentes até uma temperatura suficientemente elevada para ultrapassar as referidas barreiras energéticas e depois, arrefecer lentamente até ser atingido um estado de energia mínimo. Os factores de estrutura do sistema calculados periódicamente durante o processo de refinamento, F_{calc} , são restringidos aos factores de estrutura observados como valores alvo adicionando o termo de discrepância cristalográfica, $E_x = k_x \times \sum_{hkl} [|F_{\text{obs}}(hkl)| - k |F_{\text{calc}}(hkl)|]^2$, onde k_x é um factor de ponderação e k é um factor de escala entre $|F_{\text{obs}}(hkl)|$ e $|F_{\text{calc}}(hkl)|$. A energia total $E_x + E_{\text{pot}}$, onde E_{pot} se refere à energia potencial do sistema, é minimizada durante o processo de refinamento.

5.1. Materiais e Métodos

5.1.1. Construção do Modelo e Refinamento [80]

O modelo molecular inicial foi construído e, entre ciclos de refinamento, ajustado aos mapas de densidade electrónica utilizando o programa O [90].

A fase inicial do refinamento foi efectuada com o programa XPLOR [89] recorrendo ao método de “têmpera simulada” e utilizando os dados de difracção medidos ao comprimento de onda λ_4 até à resolução de 2.5 Å (ver subcapítulo IIA.4.1.3) e posteriormente utilizando o conjunto de dados de difracção medidos até resolução mais elevada, 1.9 Å, para um cristal crescido também na presença de hexacianoferrato de potássio (ver subcapítulo IIA.3.2.). Os dados de difracção de baixa resolução, inferior a 8.0 Å, não foram considerados nesta fase do refinamento porque não foi efectuada a modelação do solvente difuso. O programa SHELX-93 [86] foi utilizado para finalizar o refinamento do modelo completo usando as reflexões incluídas no intervalo de resolução de 20.0 a 1.9 Å. Neste caso não foram utilizados os factores de estrutura determinados para cada reflexão pelo programa TRUNCATE [61], mas as suas intensidades directamente obtidas utilizando o programa SCALEPACK [60]. Foi efectuada a modelação do solvente difuso com base no princípio de Babinet [91] e efectuado o refinamento de mínimos quadrados utilizando o algoritmo de gradiente conjugado estabelecido por Hendrickson e Konnert [84].

As restrições estereoquímicas utilizadas para a proteína foram as estabelecidas por Engh e Huber [92] segundo os parâmetros geométricos obtidos a partir da base de dados estrutural para moléculas orgânicas, Cambridge Structural Data Base. Durante a

totalidade do processo de refinamento não foram impostas restrições geométricas entre os átomos de ferro e os seus ligandos.

Os factores R e R -free [83], $R = \frac{\sum_{hkl} ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum_{hkl} |F_{obs}|}$, calculados após cada fase do protocolo de cada ciclo de refinamento serviram para ajuizar da validade das alterações introduzidas no modelo, quer durante o processo de ajuste aos mapas de densidade electrónica quer pelo próprio protocolo de refinamento utilizado. O cálculo do factor R foi baseado em 11017 ou 12875 reflexões no intervalo de resolução de 8.0 a 1.9 Å ou 20.0 a 1.9 Å, respectivamente. O cálculo do R -free foi baseado em 5% do total de reflexões seleccionadas aleatoriamente e não utilizadas para os cálculos efectuados durante o processo de refinamento, incluindo 573 reflexões para o primeiro intervalo de resolução e 689 para o segundo. Para o mesmo intervalo de resolução, os mesmos conjuntos de reflexões foram utilizados durante todos os ciclos de refinamento e para o cálculo do factor R -free.

Os mapas de densidade electrónica foram calculados com o programa XPLOR e convertidos para o formato aceite pelo programa O utilizando o programa MAPMAN [93]. A resolução utilizada para o cálculo dos mapas de densidade electrónica coincide com o intervalo de resolução utilizado no ciclo de refinamento imediatamente anterior. Foram calculados mapas de densidade electrónica de coeficientes $2|F_o| - |F_c|$ e $|F_o| - |F_c|$. Os primeiros foram utilizados para a modelação da estrutura recorrendo-se aos segundos para indicação adicional de zonas a corrigir. Para zonas em que a qualidade dos mapas não permitia decidir sobre a construção do modelo ou para a sua confirmação recorreu-se à utilização de mapas de densidade electrónica calculados com a região duvidosa omitida (mapa OMIT).

A adição de moléculas de água ao modelo molecular foi iniciada após ter sido efectuado o refinamento dos parâmetros de vibração térmica por grupos de átomos

(cadeia lateral e principal) para cada resíduo e dos parâmetros de vibração térmica isotrópica individuais. As moléculas de água foram adicionadas em posições correspondentes a máximos positivos dos mapas diferença de densidade electrónica, $|F_o| - |F_c|$, de intensidade significativa quando as interacções estabelecidas por pontes de hidrogénio são apropriadas (nomeadamente a distância N-O ou O-O está incluída no intervalo 2.5 a 3.5 Å). Para as moléculas de água cujo refinamento conduziu a factores de temperatura elevados (cerca de 1.3 vezes superior ao parâmetro de vibração térmica médio determinado para as cadeias laterais) a ocupação foi satisfatoriamente reduzida para 0.5.

Foi atribuído um factor de ocupação igual a zero aos átomos pertencentes a cadeias laterais cujo posicionamento não foi localizado nos mapas de densidade electrónica.

A qualidade estereoquímica do modelo final foi estimada com os programas PROCHECK [94] e XPLOR [89]. Todos os desenhos com representações de estruturas moleculares foram efectuados com o programa TURBO-FRODO [95].

5.1.2. Cálculo de mapas residuais utilizando o formalismo de máxima verosimilhança

A formulação de um modelo de mínimos quadrados é sempre efectuada como um modo para transformar certos valores dos parâmetros do modelo nos denominados “valores calculados”, considerados livres de erro, para posterior comparação com “valores observáveis”. As estimativas do erro são depois obtidas examinando a discrepância residual entre as quantidades “calculadas” e as “observáveis”. O modelo baseado no formalismo de máxima verosimilhança (*maximum likelihood*) contrasta com este, uma vez que estabelece as suas previsões para as “observáveis”

directamente na forma de distribuições de probabilidade, aparecendo usualmente as quantidades denominadas “calculadas” segundo o formalismo de mínimos quadrados, como parâmetros destas distribuições.

O formalismo de máxima verosimilhança permite verificar a existência de diferenças sistemáticas entre os dados de difracção e o modelo. Para cada reflexão são calculados os gradientes do logaritmo da função de máxima verosimilhança relativamente às partes reais e imaginárias dos vários factores de estrutura para os átomos pesados $F_{j+}^H(\mathbf{h})$. Estes valores são depois usados no cálculo das sínteses de Fourier para produzir os mapas residuais que apresentam uma simetria idêntica à do cristal. Do mesmo modo, quando existe nos dados de difracção sinal anómalo significativo, os gradientes relativos a $(F_{j+}^H + F_{j-}^H)$ tornam-se coeficientes para mapas residuais isomorfos e os relativos a $(F_{j+}^H - F_{j-}^H)$ para mapas residuais anómalos.

A detecção de sítios com baixa ocupação é efectuada utilizando a informação total não distorcida da fase disponível a partir dos dados no estado corrente do refinamento. Para tal são calculadas sínteses de Fourier em que os coeficientes são diferenças entre os dados do derivado e do nativo ponderadas com base na variância inversa [96].

Os mapas residuais foram calculados pelo programa SHARP [96] utilizando os dados de difracção com diferenças anómalas recolhidos ao comprimento de onda do patamar de absorção do ferro (ver subcapítulos IIA.4.1.3. e IIA.4.2.3.) até à resolução de 2.5 Å, considerando as coordenadas refinadas para os átomos de ferro e os valores de f' e f'' teóricos para o ferro.

As alterações sugeridas pelos mapas residuais ao modelo refinado da DFX foram introduzidas e o modelo alterado refinado com o programa SHELX-97 [87], de acordo com o procedimento já descrito para o refinamento previamente efectuado da

estrutura da DFX (ver subcapítulo IIA.5.1.1.). Foram utilizadas restrições estereoquímicas para a geometria do ião hexacianoferrato de acordo com os valores determinados para esta estrutura depositada no Cambridge Structural Data Base.

5.2. Resultados

5.2.1. Refinamento e Modelação Molecular [80]

No modelo inicial não foram incluídos os resíduos de 40 a 47 devido à má qualidade do mapa de densidade electrónica nesta zona exposta ao solvente.

O protocolo utilizado para o primeiro ciclo de refinamento incluiu minimização de corpo rígido e refinamento por “têmpera simulada” a 3000 K utilizando o conjunto de dados de difracção até à resolução de 2.5 Å. O valor do factor R passou de 40.5% para 28.0%. Após mais alguns ciclos de refinamento não foi alcançada uma melhoria significativa dos mapas de densidade electrónica, tendo o refinamento prosseguido utilizando o conjunto de reflexões disponível de maior resolução, 1.9 Å. Os valores do factor R e R -free calculados considerando esta resolução máxima eram respectivamente de 40.4 e 44.2%. Após refinamento de corpo rígido, refinamento por “têmpera simulada” a 3000 K e refinamento gradual dos parâmetros de vibração térmica para os vários átomos efectuado com o programa XPLOR estes valores foram reduzidos para 24.5 e 30.1%, respectivamente,. A melhoria nos mapas de densidade electrónica permitiu a inserção dos oito resíduos em falta e de 56 moléculas de água.

Uma diminuição significativa nos valores de R e de R -free foi observada quando se iniciou o refinamento com o programa SHELX-93 e quando foi incluído o refinamento anisotrópico do factor de vibração térmica para os átomos com maior

poder de difracção, ferro, enxofre e cálcio (ver à frente ainda neste subcapítulo). Os valores de R e R -free convergiram para 19.6 e 23.1%, respectivamente. Na tabela IIA.8 são apresentados os valores dos parâmetros de deslocamento anisotrópico, U_{ij} , para os três tipos de átomos.

Tabela IIA.8. Parâmetros de deslocamento anisotrópico, U_{ij} , para os átomos a que foi efectuado o refinamento anisotrópico do factor de vibração térmica.

Átomo	U_{11}	U_{22}	U_{33}	U_{23}	U_{13}	U_{12}
FeI	0.43773	0.33795	0.25421	-0.01510	-0.10513	0.09273
FeII	0.59787	0.40216	0.32853	0.07135	-0.09647	0.17324
S γ -Cys9	0.40308	0.37151	0.26025	0.03305	-0.05789	0.09622
S γ -Cys12	0.49526	0.36171	0.21289	-0.07388	-0.08518	0.13106
S γ -Cys28	0.37878	0.33047	0.23498	-0.01761	-0.07230	0.08179
S γ -Cys29	0.53447	0.38075	0.26393	-0.04123	-0.14095	0.08113
S δ -Met33	0.38837	0.41271	0.29496	-0.00358	-0.06150	0.13305
S δ -Met36	0.53474	0.47575	0.44941	-0.17301	-0.05717	0.25715
S δ -Met45	0.57211	2	2	-0.50323	0.09796	0.12199
S δ -Met70	0.53829	0.29044	0.21279	0.01461	0.05898	0.13672
S γ -Cys115	0.65667	0.34803	0.18334	0.06267	-0.06908	0.13801
Ca	0.66433	0.66433	0.43379	-0.01218	0.01218	0.212013

O factor de vibração térmica, B , está relacionado com o deslocamento quadrático médio, $\overline{u^2}$, através da expressão $B = 8\pi \times \overline{u^2}$, sendo considerada vibração anisotrópica $\overline{u^2}$ tem diferentes componentes projectadas ao longo dos eixos cristalográficos U_{11} , U_{22} , U_{33} ao longo de a^* , b^* e c^* , respectivamente. O factor de temperatura, T , é neste caso dado por $\exp[-2\pi^2(U_{11}h^2a^{*2} + U_{22}k^2b^{*2} + U_{33}l^2c^{*2} + 2U_{12}hka^*b^* + 2U_{13}hla^*c^* + 2U_{23}klb^*c^*)]$.

A variação dos factores R e R -free durante o processo de refinamento, utilizando o conjunto de reflexões com resolução máxima de 1.9 Å, está representada na figura IIA.14. No último ciclo de refinamento foi utilizado o conjunto total de reflexões não tendo sido verificadas alterações quer no modelo quer no valor do factor R , o que

permitiu concluir que a exclusão das reflexões utilizadas para o cálculo do *R-free* não afectou o resultado final do processo de refinamento.

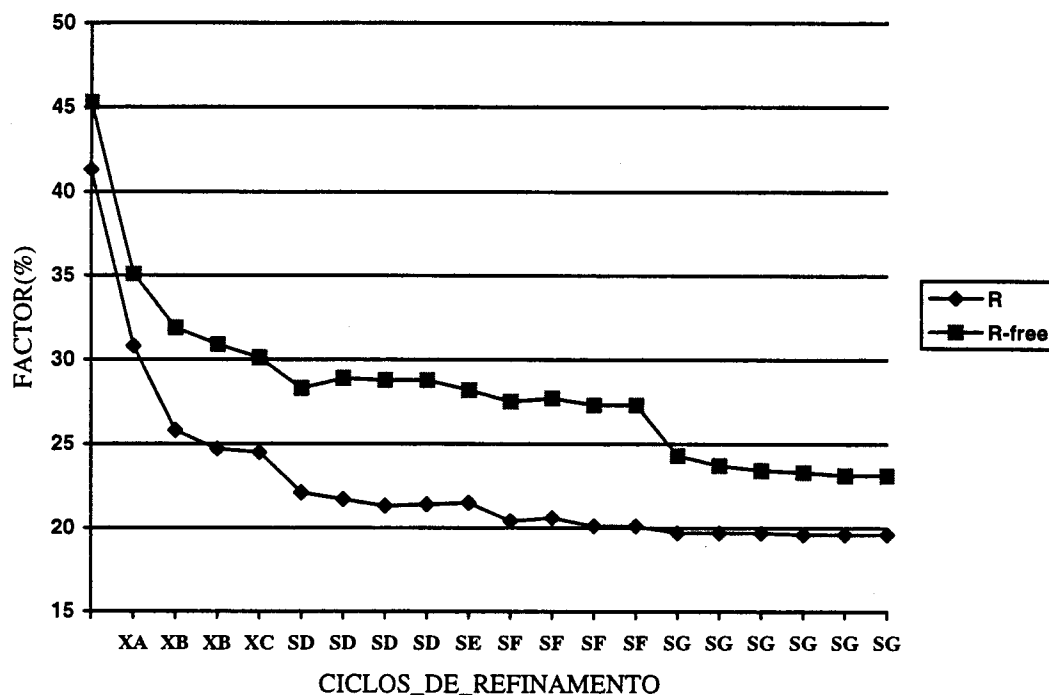


Figura IIA.14. Variação dos factores *R* e *R-free* ao longo do processo de refinamento utilizando o conjunto de dados com resolução máxima de 1.9 Å. Os ciclos de refinamento efectuados com o programa XPLOR estão identificados com X e os efectuados com o programa SHELX-93 estão identificados com S. A segunda letra identifica o protocolo de refinamento utilizado: A, refinamento de corpo rígido, de “têmpera” simulada e do B global; B, refinamento de “têmpera” simulada, de B global, de B por grupos (cadeia principal e cadeia lateral para cada resíduo), adição de moléculas de solvente; C, igual a B agora com o modelo completo, D, refinamento de mínimos quadrados, de B individuais, E, igual a D com adição do ião cálcio; F, igual a E com refinamento de B anisotrópico para átomos de ferro; G, igual a F com refinamento de B anisotrópico para os átomos de enxofre e cálcio e utilização de intensidades originais em vez de factores de estrutura calculados externamente.

Dois máximos de densidade persistiram nos mapas $2|F_o| - |F_c|$ e $|F_o| - |F_c|$ durante o processo de refinamento. A 4.9 Å do átomo de ferro pertencente ao centro II e na direcção de um possível sexto ligando (ver descrição da estrutura na Parte IV.Discussão), porém a uma distância não passível de ligação com nenhum outro átomo da estrutura, foi observado um máximo com uma intensidade de cerca de 6.5σ

(considerando o valor de σ do mapa $|F_o| - |F_c|$). Sobre o eixo binário cristalográfico que relaciona dois monómeros (ver descrição da estrutura na Parte IV.Discussão) permaneceu uma esfera de densidade com intensidade dupla da em média atribuída a uma molécula de água. Na sua vizinhança, a distâncias entre os 2.7 e 3.1 Å, encontram-se átomos de oxigénio pertencentes a vários resíduos de aminoácidos. Devido à natureza química dos possíveis ligandos presentes e ao facto da presença de iões cálcio ser indispensável para o processo de cristalização, este máximo de densidade foi atribuído a um ião cálcio e refinado como tal.

Na tabela IIA.9 estão resumidos os parâmetros estatísticos para o refinamento da DFX.

Tabela IIA.9. Estatística para o processo de refinamento.

Parâmetros	
Número de resíduos	125
Número de átomos (excluindo átomos de hidrogénio)	975
Número de moléculas de água incluídas	71
Intervalo de resolução (Å)	20.0-1.9
Factor R ($F > 4\sigma(F); F > 0$)* (%)	18.7;19.6
Número de reflexões	12875
Factor R -free ($F > 4\sigma(F); F > 0$) (%)	21.3;23.1
Número de reflexões	689

Factor $R = \frac{\sum_{hkl} ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum_{hkl} |F_{obs}|}$

5.2.2. Interpretação de mapas residuais calculados utilizando o formalismo de máxima verosimilhança

Os valores de f' e f'' para os átomos de ferro obtidos após processamento com o programa SHARP não foram significativamente alterados. Os mapas residuais calculados utilizando o sinal anómalo do ferro ao comprimento de onda a que f' é máximo ($\lambda_1 = 1.7417$ Å) mostram a existência de um máximo de intensidade positiva

significativa (cerca de 17σ) a cerca de 5 Å do átomo de ferro II na direcção da sexta posição de coordenação, como mostra a figura IIA.15. A localização deste máximo coincide com a de um máximo que persistiu nos mapas de densidade electrónica $2|F_o|-|F_c|$ e $|F_o|-|F_c|$ durante o refinamento da estrutura da DFX (ver subcapítulo IIA.5.2.1.).

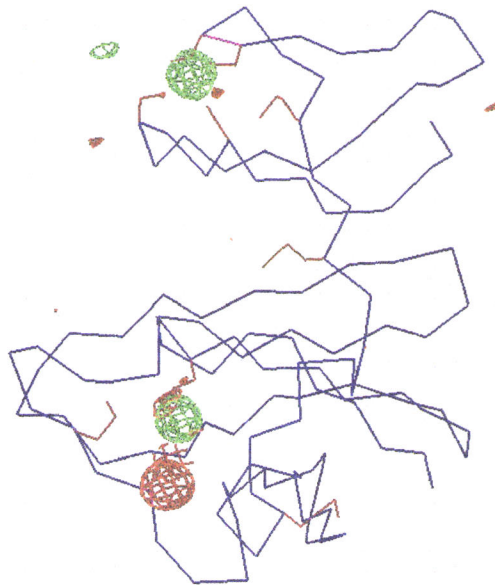


Figura IIA.15. Mapas residuais calculados utilizando o sinal anómalo do ferro ao comprimento de onda $\lambda_1=1.7417$ Å e considerando a existência no modelo dos átomos de ferro I e II. Estão representadas as zonas de densidade electrónica superiores a 6σ , as zonas a verde representam as posições ocupadas pelos átomos de ferro considerados no modelo e as zonas a vermelho representam posições onde é sugerida a presença de uma estrutura não considerada no modelo, neste caso atribuída ao átomo de ferro III. As posições ocupadas pelos átomos C α na cadeia polipeptídica estão representadas a azul e as cadeias laterais dos resíduos metionina e cisteína estão representadas a vermelho. O desenho foi efectuado com o programa O [90].

O facto deste máximo residual apresentar maior intensidade ao comprimento de onda a que é máximo o valor de f'' para o ferro e tendo em conta que foi adicionado hexacianoferrato de potássio ao ensaio de cristalização permite sugerir que seja atribuído a um átomo de ferro (Fe_{CN}). Pode ainda acrescentar-se que a distância ferroII-ferro $_{CN}$ permite a existência de um grupo cianeto que estabelecerá a ligação entre os dois átomos. O refinamento da estrutura da DFX após a introdução deste terceiro átomo de ferro, fixando o seu factor de vibração térmica num valor idêntico

ao do átomo de ferro II, conduziu a um valor de ocupação de cerca de 34%, sendo acompanhado de uma diminuição de 0.2 e 0.4%, respectivamente, para os valores dos factores R e R -free. Foi ainda possível diminuir, respectivamente, de 0.5 e 0.3% estes factores após a introdução na estrutura de dois grupos cianeto como ligandos do ião hexacianoferrato. A sua ocupação foi fixada em 34% e os factores de vibração térmica calculados não são significativamente superiores aos obtidos para o terceiro átomo de ferro, como se pode verificar da consulta da tabela IIA.10.

Tabela IIA.10. Factores de vibração térmica para o ião hexacianoferrato.

Átomo	Factor de vibração térmica (\AA^2)
Fe _{CN}	40.1
C1	41.1
N1	40.0
C2	52.2
N2	48.0

Foram recalculados os mapas residuais utilizando o programa SHARP [96] após a introdução do terceiro átomo de ferro. Os valores de f' e f'' refinados para este átomo não são significativamente diferentes dos valores teóricos para o ferro. Surgem máximos residuais positivos para o comprimento de onda que maximiza a contribuição anómala dos átomos de enxofre e simultaneamente minimiza a contribuição anómala do ferro ($\lambda_3=1.7514 \text{ \AA}$) (a altura destes máximos é superior a 6σ), porém apenas oito dos nove átomos de enxofre presentes na estrutura são identificáveis, como pode ser verificado por observação da figura IIA.16A. Nos mapas residuais recalculados após a introdução dos nove átomos de enxofre identificados continua a não surgir um máximo residual positivo na posição ocupada pelo átomo S δ da Met45 (ver figura IIA.16B). Por outro lado, os valores elevados dos

factores de vibração térmica para os átomos S δ e C ϵ (143.9 e 79.0 Å²) reflectem a inexistência de densidade electrónica para essa zona da cadeia lateral do resíduo Met45. Além de que este resíduo não é conservado na sequência de aminoácidos conhecidas para desulfoferrodoxinas, na sequência de aminoácidos da DFX de *D. vulgaris* a posição 45 é ocupada por uma lisina. Estes factos sugerem a mutação deste resíduo por outro com uma cadeia lateral menos longa e sem enxofre na sua composição. A leucina parece ser o resíduo cuja geometria da cadeia lateral melhor se ajusta à forma da densidade electrónica. A introdução desta mutação na estrutura foi refinada, obtendo-se valores aceitáveis para os parâmetros de vibração térmica dos átomos da cadeia lateral (entre 48.0 e 54.0 Å²) e um bom ajuste da estrutura à densidade electrónica, como se mostra na figura IIA.17. Os valores dos factores *R* e *R*_{free} diminuíram de 0.4 e 0.3%, respectivamente.

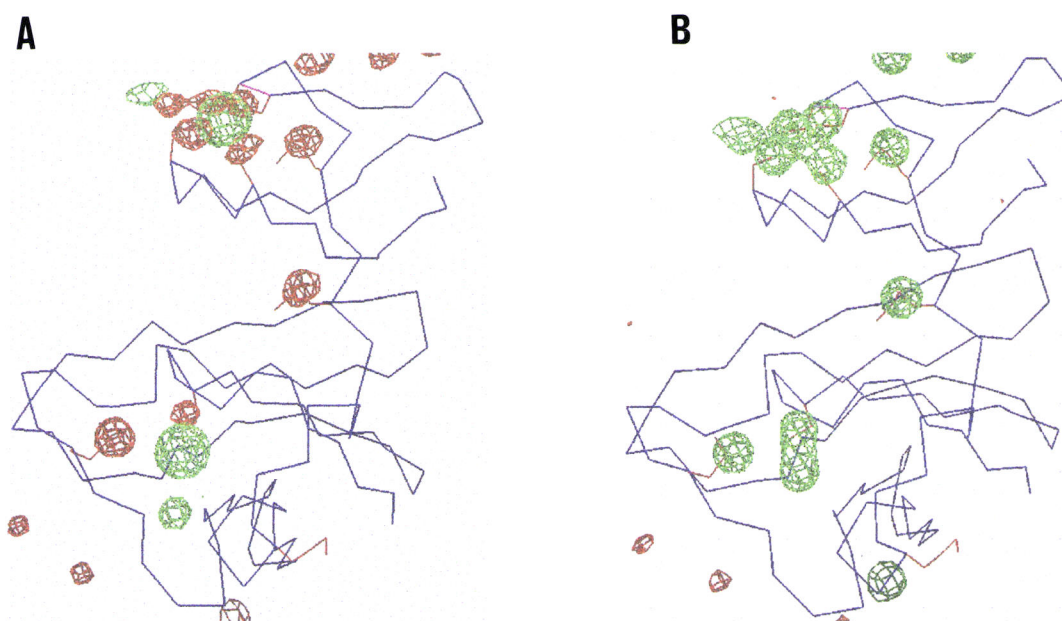


Figura IIA.16. Mapas residuais calculados utilizando o sinal anómalo do enxofre ao comprimento de onda $\lambda_3=1.7514$ Å e considerando a existência no modelo dos **A)** átomos de ferro I, II e III; **B)** dos três átomos de ferro e dos oito átomos de enxofre localizados no mapa A). Estão representadas as zonas de densidade electrónica superiores a 6σ , as zonas a verde representam as posições ocupadas pelos átomos de A) ferro e B) ferro e enxofre considerados no modelo e as zonas a vermelho representam posições onde é sugerida a presença de uma estrutura não considerada no modelo, neste caso os átomos de enxofre presentes nas cadeias laterais das metioninas e cisteínas. As posições ocupadas pelos átomos C α na cadeia polipeptídica estão representadas a azul e as cadeias laterais dos resíduos metionina e cisteína estão representadas a vermelho. O desenho foi efectuado com o programa O [90].

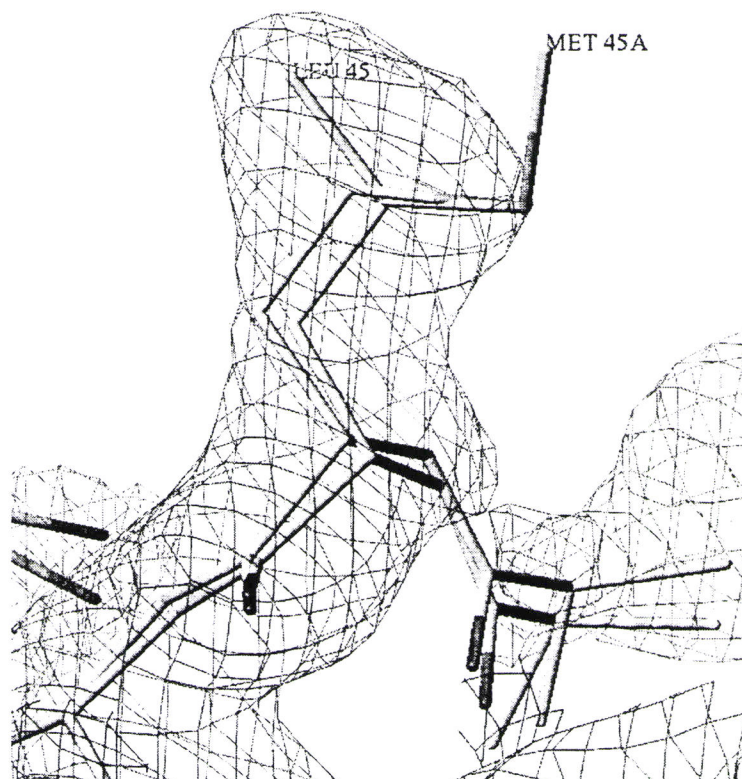


Figura IIA.17. Densidade electrónica $2|F_o|-|F_c|$ (1.0σ) para a cadeia lateral da leu45. Em sobreposição está representada a cadeia polipeptídica antes de ter sido considerada e refinada a mutação da met45 por uma leucina.

5.2.3. Avaliação da Qualidade do Modelo Final

O modelo final [80] inclui os 125 aminoácidos presentes na sequência, 2 átomos de ferro, 71 moléculas de água, um ião hexacianoferrato apenas com dois ligandos cianeto e um ião cálcio situado sobre o eixo binário cristalográfico que relaciona os dois monómeros. Os valores dos parâmetros usados para estimar a qualidade do modelo final são apresentados na tabela IIA.11.

Tabela IIA.11. Avaliação da qualidade do modelo final

Parâmetros	
Factor de vibração térmica médio (\AA^2):	
Átomos da cadeia principal	34.1
Átomos das cadeias laterais	37.8
Átomos pertencentes aos centros metálicos (I;II)	32.6;37.8
Moléculas de água	40.8
Ligandos do ião cálcio	27.2
Número de átomos com factor de ocupação zero	8
Número de moléculas de água com ocupação 0.5	27
Factor R ($F > 4\sigma(F); F > 0$) (%)	17.8;18.5
Factor R_{free} ($F > 4\sigma(F); F > 0$) (%)	20.2;22.1
Desvios quadráticos médios em relação a valores ideais (Engh e Huber[92]):	
Comprimentos de ligação (\AA)	0.02
Ângulos de ligação ($^\circ$)	2.3
Ângulos de torsão ($^\circ$) (não restringidos)	30.7
Ângulos de planaridade ($^\circ$)	2.5
Curva de Ramachandran (excluindo resíduos Gly e Pro):	
Resíduos em regiões mais favoráveis (%)	89.4
Resíduos em regiões permitidas (%)	10
Resíduos em regiões menos favoráveis (%)	1
Resíduos em regiões não permitidas (%)	0
Outros indicadores da qualidade estrutural:	
Número de maus contactos	0
Desvio do ângulo Omega médio em relação a valor ideal ($^\circ$)	3.2
Desvio do ângulo Zeta médio em relação a valor ideal ($^\circ$)	3.7
Factor $R = \frac{\sum_{hkl} F_{obs} - F_{calc} }{\sum_{hkl} F_{obs} }$	

A única região do modelo para a qual não foi obtida densidade electrónica contínua corresponde à zona exposta ao solvente desde o resíduo Thr41 até ao resíduo Ala44 (ver figura IIA.18). O valor médio do factor de vibração térmica considerando os átomos da cadeia principal é de 90.2, 2.6 vezes superior ao valor médio determinado considerando todos os átomos da cadeia principal da DFX, reflectindo a elevada flexibilidade ou a desordem estatística desta zona. A análise do gráfico da variação do

factor de vibração térmica médio considerando os átomos da cadeia principal para cada resíduo (figura IIA.19) mostra que esta é a única região da cadeia polipeptídica em que se verifica este tipo de comportamento.

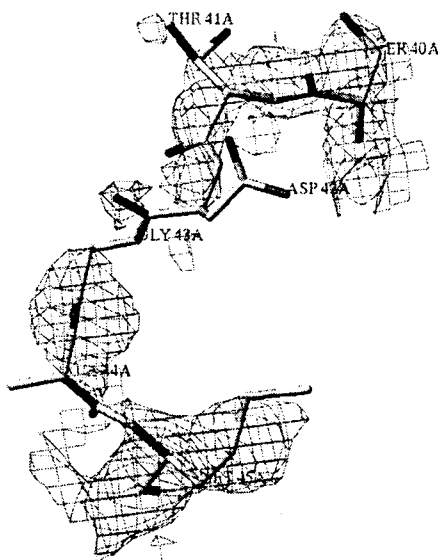


Figura IIA.18. Representação da densidade eletrônica $2|F_o|-|F_c|$ (1.0σ) para a zona da cadeia polipeptídica Thr41-Ala44.

Verifica-se ainda, como seria de esperar, que para a generalidade dos resíduos o valor do factor B médio é mais elevado para os átomos da cadeia lateral relativamente ao determinado para os átomos da cadeia principal.

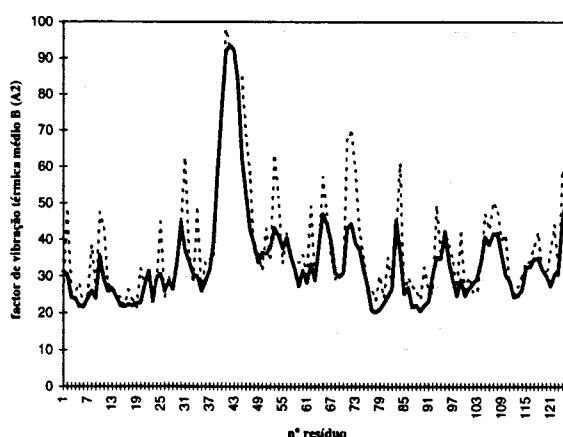


Figura IIA.19. Factores de vibração térmica isotrópicos médios para os átomos da cadeia principal (traço contínuo) e para os átomos da cadeia lateral (tracejado) para os vários resíduos da cadeia polipeptídica da DFX.

Os factores de vibração térmica determinados para os átomos de ferro (31.8 e 39.1 Å², respectivamente para os centros I e II) são semelhantes aos valores médios calculados para os seus ligandos o que está de acordo com a ocupação total atribuída a estes íões. A densidade para as cadeias laterais dos resíduos Asp42 e Lys108 está totalmente ausente, sendo zero o valor do factor de ocupação atribuído a estes átomos.

O traçado do gráfico de Ramachandran [97] representado na figura IIA.20. mostra que apenas um resíduo ocupa uma zona correspondente a conformações energeticamente menos favoráveis, Asp84. Este resíduo está localizado num “β-hairpin loop” formado por dois resíduos, Asp84 e Gly85, estabelecendo os resíduos terminais deste “loop” duas pontes de hidrogénio (ver figura IIA.21). Segundo Sibanda *et al* [98] este “β-hairpin loop” é classificado como 2:2 do tipo I', devido à presença na sequência de um resíduo de ácido aspártico seguido de um resíduo de glicina. Os ângulos de Ramachandran apresentados pelo resíduo Asp84 são igualmente característicos deste tipo de volta.

O factor G total determinado pelo programa PROCHECK para a cadeia principal é uma medida do desvio dos ângulos de torção, distâncias e ângulos de ligação relativamente a parâmetros estereoquímicos estabelecidos segundo Morris *et al* [99] e segundo Engh e Huber [92], considerando, respectivamente, estruturas de proteínas determinadas a elevada resolução e os dados disponíveis no Cambridge Structural Data Base. Para a estrutura refinada da DFX este factor, que permite avaliar a qualidade da estrutura na globalidade, tem o valor de -0.2, sendo o valor do factor G para estruturas com a mesma resolução nominal igual a -0.3 ± 0.3 .

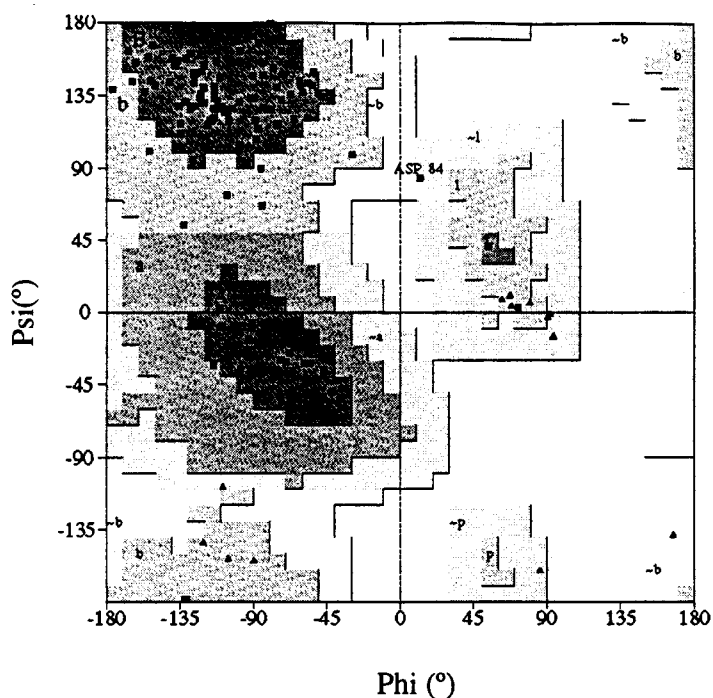


Figura IIA.20. Representação gráfica da distribuição dos ângulos de torção, ϕ e ψ , para todos os resíduos de aminoácidos, à exceção dos terminais da cadeia, na estrutura refinada da desulfoferrodoxina (gráfico de Ramachandran). Os resíduos de glicina estão representados por triângulos e os restantes resíduos por quadrados. A sombreado estão representadas as zonas favoráveis para os diferentes tipos de estrutura secundária, correspondendo a região mais escura à conformação mais favorável para cada tipo de estrutura secundária: A-hélice α com enrolamento à direita, B-folha β , L-hélice α com enrolamento à esquerda e P-epsilon. Gráfico traçado com o programa PROCHECK [94].

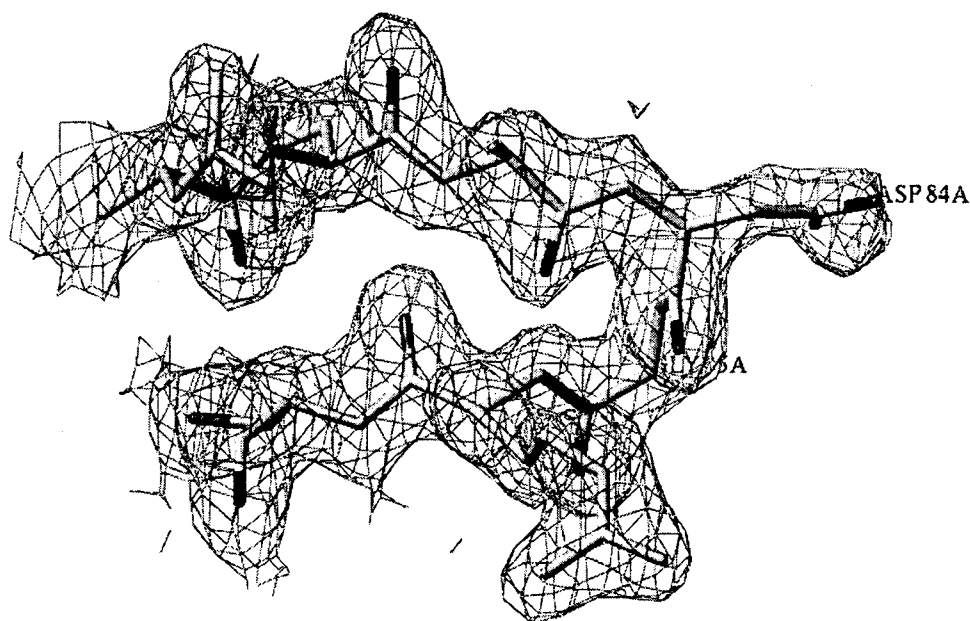


Figura IIA.21. Representação do β -hairpin loop 2:2 do tipo I'em que estão envolvidos os resíduos Asp84 e Gly85. É possível visualizar as duas pontes de hidrogénio estabelecidas pelos resíduos terminais do loop. O mapa de densidade electrónica $2|F_o|-|F_c|$ está representado a 1.0σ .

A equação de Cruickshank [100, 101] permite estimar aproximadamente o erro médio para as coordenadas atômicas, ($\sigma(x)$):

$$\sigma(x)^2 = N_a / (N_o - N_p) \cdot R_{conv}^2 \cdot d_{min}^2 \cdot C^{-2/3}$$

onde C é a proporção de dados recolhidos relativamente aos possíveis teoricamente para uma determinada resolução máxima, R_{conv} é o valor de factor R, d_{min} é a resolução máxima, N_a é o número de átomos incluídos no refinamento, N_o é o número de observações e N_p é o número de parâmetros refinados. Esta equação não considera o efeito das restrições geométricas e não pode ser utilizada quando o número de observações for inferior ao número de parâmetros refinados. Assumindo que o factor R_{free} é o valor esperado para o factor R pode calcular-se:

$$\sigma_{free}(x)^2 = N_a / N_o \cdot R_{free}^2 \cdot d_{min}^2 \cdot C^{-2/3}$$

Sendo o valor de R_{free} independente da informação sobre as restrições e as parameterizações usadas no refinamento, esta equação tem significado em todas as situações [102].

Os valores de $\sigma(x)$ e $\sigma_{free}(x)$ para o modelo refinado da DFX são 0.140 e 0.130 Å, respectivamente.

Tendo em conta os vários tipos de análise a que o modelo refinado da DFX foi submetido pode concluir-se que a estrutura está bem determinada, sendo a precisão obtida para as coordenadas atômicas aproximadamente 0.14 Å, a sua qualidade estereoquímica é elevada, conforme foi avaliado pelo factor G e apresenta uma boa concordância com os dados de difracção ($R=18.5\%$).

B. Determinação da estrutura e refinamento da forma cristalina monoclinica

1. Materiais e Métodos

1.1. Determinação da estrutura através do método de substituição molecular

Para a determinação da estrutura da DFX na forma cristalina monoclinica os cálculos foram efectuados com o bloco de programas AMORE [78, 79] utilizando as intensidades recolhidas no Laboratório de Biofísica Molecular da Universidade de Oxford para um cristal monoclinico crescido na presença de hexacianoferrato de potássio até a resolução de 2.15 Å (ver subcapítulo II.A.3.2.) e, como modelo, as coordenadas da estrutura refinada para a forma cristalina romboédrica. Foram utilizados os dados de difracção no intervalo de resolução entre 20 e 3 Å e um raio de Patterson de 20 Å para a região de integração.

O valor da altura dos máximos obtidos para a sobreposição das funções de Patterson resultantes do cálculo da função de rotação e os valores do coeficiente de correlação e do factor R , $R = \frac{\sum_{hkl} ||F_{obs}| - k|F_{calc}||}{\sum_h |F_{obs}|}$, determinados para as soluções da função de translação e do processo de refinamento permitiram decidir quais as melhores soluções para o método de substituição molecular. A validade das soluções

encontradas foi confirmada por visualização do empacotamento das moléculas do modelo reorientado de acordo com os parâmetros posicionais (α , β , γ , x , y , z) determinados. Este procedimento permite verificar a existência apenas de contactos de van der Waals com distâncias razoáveis entre as várias moléculas presentes na célula unitária

1.2. Refinamento e modelação molecular

A fase inicial do refinamento foi efectuada com o programa XPLOR [89] recorrendo ao método de “têmpera simulada” e utilizando os dados de difracção recolhidas no Laboratório de Biofísica Molecular da Universidade de Oxford para um cristal monoclinico crescido na presença de hexacianoferrato de potássio (ver subcapítulo II.A.3.2.), também utilizados para a resolução da estrutura pelo método de substituição molecular. Os dados de difracção de baixa resolução, inferior a 8.0 Å, não foram considerados nesta fase do refinamento quando não foi efectuada a modelação do solvente difuso, passando a ser incluídos quando esta correcção foi introduzida. Os dados de difracção de maior resolução (2.5 a 2.15 Å) foram também considerados apenas no processo final desta fase de refinamento. O programa SHELXL-97 [87] foi utilizado para finalizar o refinamento do modelo completo usando as reflexões incluídas no intervalo de resolução de 20.0 a 2.15 Å. Neste caso não foram utilizados os factores de estrutura determinados para cada reflexão pelo programa TRUNCATE [61], mas as suas intensidades directamente obtidas utilizando o programa SCALEPACK [60]. Foi realizada a modelação do solvente difuso com base no

princípio de Babinet [91] e efectuado o refinamento de mínimos quadrados utilizando o algoritmo de gradiente conjugado estabelecido por Hendrickson e Konnert [84].

As restrições estereoquímicas foram utilizadas tal como descrito no subcapítulo IIA.5.1.1. Foram ainda utilizadas restrições devido à presença de simetria não cristalográfica na unidade assimétrica iguais para todos os resíduos durante todo o processo de refinamento e com ponderações diferentes para os átomos da cadeia principal e da cadeia lateral durante a primeira fase do refinamento efectuada com o programa XPLOR.

Os factores R e R -free [83] calculados como descrito no subcapítulo IIA.5.1.1. foram utilizados com os objectivos também aí descritos. O cálculo do factor R foi baseado em 9353 ou 15252 reflexões no intervalo de resolução de 8.0 a 2.5 Å ou 20.0 a 2.15 Å, respectivamente. O cálculo do R -free foi baseado em 5% do total de reflexões seleccionadas aleatoriamente não utilizadas para os cálculos efectuados durante o processo de refinamento, incluindo 505 reflexões para o primeiro intervalo de resolução e 826 para o segundo. Para o mesmo intervalo de resolução, os mesmos conjuntos de reflexões foram utilizados durante todos os ciclos de refinamento e para o cálculo do factor R -free.

Os mapas de densidade electrónica foram calculados com o programa XPLOR e convertidos para o formato aceite pelo programa O utilizando o programa MAPMAN [93] ou calculados com o programa SHELXPRO incluído no bloco de programas SHELX-97 [87]. Tal como durante o refinamento e modelação da forma romboédrica dos cristais de DFX foram calculados os mapas de densidade electrónica de coeficientes $2|F_o| - |F_d|$ e $|F_o| - |F_d|$ e quando necessário foram calculados mapas do tipo OMIT à resolução utilizada no ciclo de refinamento imediatamente anterior.

O modelo molecular foi visualizado e ajustado, entre ciclos de refinamento, aos mapas de densidade electrónica utilizando o programa O [90].

A adição de moléculas de água ao modelo molecular foi iniciada após ter sido efectuado o refinamento dos parâmetros de vibração térmica isotrópica individual para cada átomo. O procedimento utilizado foi o já descrito no subcapítulo IIA.5.1.1.

Foi atribuído um factor de ocupação igual a zero aos átomos pertencentes a cadeias laterais cujo posicionamento não foi localizado nos mapas de densidade electrónica.

A qualidade estereoquímica do modelo final foi estimada com os programas PROCHECK [94] e XPLOR [89].

2. Resultados

2.1. Determinação da estrutura através do método de substituição molecular

De entre as soluções obtidas após o cálculo da função de rotação sobressaem quatro. Estas constituem dois pares (1 e 2; 3 e 4) estando os constituintes de cada par relacionados por simetria cristalográfica. Na tabela IIB.1 são apresentados os ângulos de Euler e a altura dos máximos para as quatro soluções.

Tabela IIB.1. Soluções para a função de rotação.

Solução	Ângulos de Euler			Altura ($x\sigma$)
	α	β	γ	
1	355.53	115.85	211.14	7.9
2	184.47	64.15	31.14	7.9
3	349.59	126.58	305.69	6.8
4	190.41	53.42	125.69	6.8

Os picos correspondentes às quatro soluções podem ser visualizados no mapa da figura IIB.1.

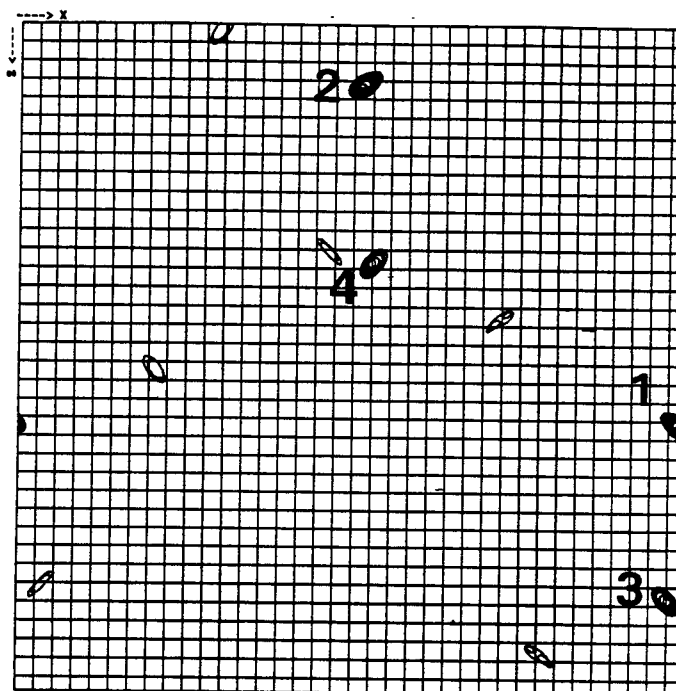


Figura IIB.1. Representação gráfica das soluções para a função de rotação calculada para cristais monoclinicos usando como modelo a estrutura refinada da DFX para a forma romboédrica. Os máximos estão assinalados de acordo com o número atribuído à solução na tabela 1. Os contornos estão representados a intervalos de 4σ começando a 1 unidade de σ . Os programas NPO e XPLOT84DRIVER (CCP4) [61] foram utilizados para traçar os gráficos.

As soluções da função de rotação foram utilizadas para o cálculo da função de translação. Os valores obtidos para os coeficientes de correlação e para o factor R são razoáveis, sugerindo que as quatro soluções consideradas são válidas (ver tabela IIB.2).

Tabela IIB.2. Soluções para a função de translação.

Solução	Parâmetros posicionais			C (%)	Factor R (%)
	x	y	z		
1	0.3333	0.0000	0.4868	44.4	49.8
2	0.1667	0.0000	0.0132	44.4	49.8
3	0.2407	0.0000	0.2105	42.6	50.7
4	0.2593	0.0000	0.2895	42.6	50.7

$$C = \frac{\sum_{hkl} (|F_{obs}| - \langle |F_{obs}| \rangle) \times (|F_{calc}| - \langle |F_{calc}| \rangle)}{[\sum_{hkl} (|F_{obs}| - \langle |F_{obs}| \rangle)^2 \sum_{hkl} (|F_{calc}| - \langle |F_{calc}| \rangle)^2]^{1/2}}$$

$$R = \frac{\sum_{hkl} ||F_{obs}| - k|F_{calc}||}{\sum_h |F_{obs}|}$$

O cálculo da função de translação foi repetido fixando-se os parâmetros posicionais para a solução 1. Os valores recalculados para as soluções 2, 3 e 4 são apresentados na tabela IIB.3. Os valores das coordenadas fraccionais foram obtidos relativamente à posição correspondente à solução 1.

Tabela IIB.3. Soluções para a função de translação após fixar os parâmetros posicionais para a solução 1.

Solução	Coordenadas fraccionais			C (%)	Factor R (%)
	x	y	z		
2	0.1667	0.4997	0.5090	45.6	49.3
3	0.7614	0.6328	0.7923	71.5	35.9
4	0.2386	0.6328	0.2077	71.5	35.9

$$C = \frac{\sum_{hkl} (|F_{obs}| - \langle |F_{obs}| \rangle) \times |F_{calc}| - \langle |F_{calc}| \rangle}{[\sum_{hkl} \langle (|F_{obs}| - \langle |F_{obs}| \rangle)^2 \rangle \sum_{hkl} \langle (|F_{calc}| - \langle |F_{calc}| \rangle)^2 \rangle]^{1/2}}$$

$$R = \frac{\sum_{hkl} ||F_{obs}| - k|F_{calc}||}{\sum_h |F_{obs}|}$$

A figura IIB.2 mostra os mapas para a função de translação após terem sido fixado os parâmetros posicionais para a solução 1.

O refinamento de mínimos quadrados permitiu melhorar significativamente os valores dos coeficientes de correlação e do factor *R* para cada uma das soluções, como pode ser confirmado consultando a tabela IIB.4, onde são apresentados os valores dos parâmetros posicionais refinados apenas para as soluções 1 e 3, uma vez que as soluções 2 e 4 estão relacionadas por simetria cristalográfica com cada uma destas. As soluções 1 e 3 correspondem a monómeros (monómeros 1 e 3, respectivamente) pertencentes a unidades assimétricas diferentes. Verificou-se que a matriz de transformação do monómero 1 no monómero 3' relacionado por simetria não cristalográfica com o monómero 3 e pertencente à mesma unidade assimétrica que o monómero 1, coincide com a matriz de rotação calculada com base na solução da função de auto-rotação. Os monómeros 1 e 3' estão, então, relacionados por simetria não cristalográfica.

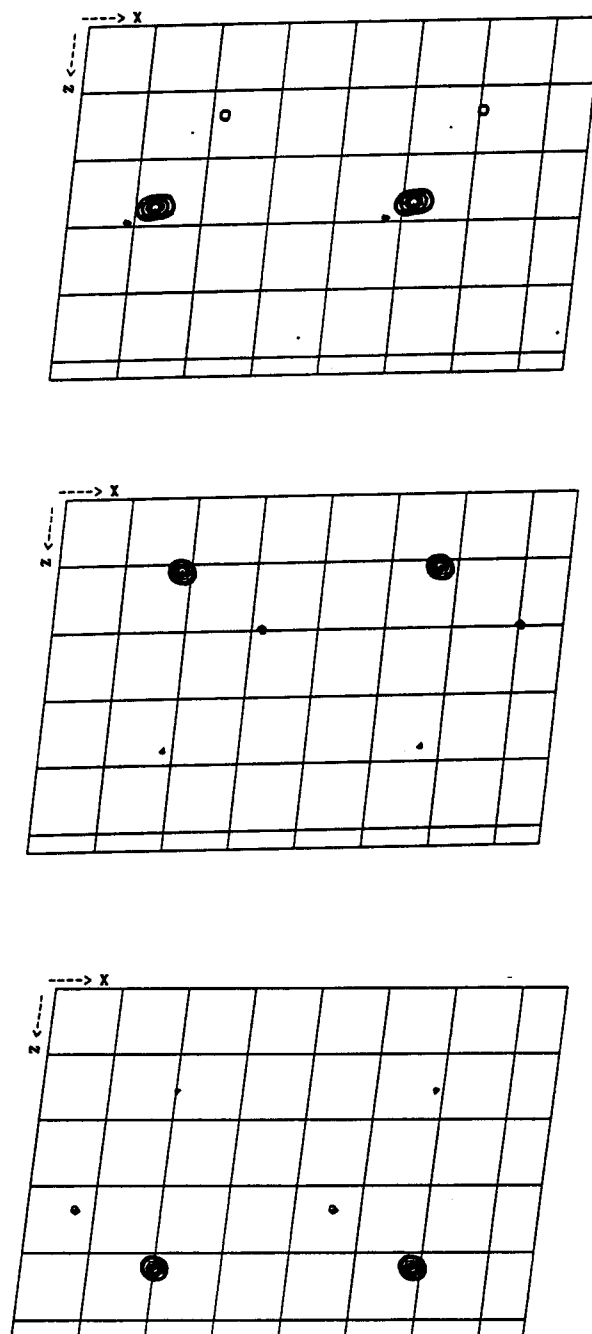


Figura IIB.2. Representação gráfica das soluções para a função de translação calculada para cristais monoclinicos usando como modelo a estrutura refinada da DFX para a forma romboédrica e considerando as soluções obtidas para a função de rotação: A) solução 2, B) solução 3 e C) solução 4. Os contornos estão representados a intervalos de 10σ começando a 5 unidade de σ . Os programas NPO e XPLOT84DRIVER (CCP4) [61] foram utilizados para traçar os gráficos.

Tabela IIB.4. Parâmetros posicionais refinados para as soluções do método de substituição molecular.

Solução	Ângulos de Euler			Coordenadas fraccionais			C (%)	Factor <i>R</i> (%)
	α	β	γ	x	y	z		
1	356.82	115.66	211.28	0.3318	0.9997	0.4926	80.9	27.4
3	350.70	126.32	307.36	0.7380	0.1337	0.2105	80.9	27.4

$$C = \frac{\sum_{hkl} (|F_{obs}| - \langle |F_{obs}| \rangle) \times |F_{calc}| - \langle |F_{calc}| \rangle}{[\sum_{hkl} \langle (|F_{obs}| - \langle |F_{obs}| \rangle)^2 \rangle \sum_{hkl} \langle (|F_{calc}| - \langle |F_{calc}| \rangle)^2 \rangle]^{1/2}}$$

$$R = \frac{\sum_{hkl} ||F_{obs}| - k|F_{calc}||}{\sum_h |F_{obs}|}$$

As moléculas do modelo após reorientadas de acordo com os parâmetros posicionais determinados apresentam um empacotamento com bons contactos de van der Waals.

2.2. Refinamento e modelação molecular

No modelo inicial foram incluídos todos os resíduos, tendo sido atribuída ocupação igual a zero aos átomos cujo posicionamento não foi localizado nos mapas de densidade electrónica.

O protocolo utilizado para o primeiro ciclo de refinamento incluiu minimização de corpo rígido, refinamento por “têmpera simulada” a 3000 K, refinamento do parâmetro de vibração térmica isotrópica global e por grupos (um parâmetro por cadeia principal e um por cadeia lateral para cada resíduo) utilizando o conjunto de dados de difracção até à resolução de 2.5 Å. O valor do factor *R* passou de 32.7% para 26.1% e o valor de *R-free* de 34.0% para 30.9%. No segundo ciclo de refinamento ainda efectuado com o programa XPLOR foi utilizado o conjunto de reflexões disponível de maior resolução até 2.15 Å e efectuada a modelação do solvente difuso. Os valores do factor *R* e *R-free* calculados considerando esta resolução máxima eram respectivamente de 33.8 e 35.8%. Após refinamento por “têmpera simulada” a 3000 K e refinamento gradual dos parâmetros de vibração térmica para os vários átomos

efectuado com o programa XPLOR estes valores foram reduzidos para 29.0 e 33.1%, respectivamente.

Uma diminuição significativa nos valores de R e de R -free foi observada quando se iniciou o refinamento com o programa SHELX-97. Os valores de R e R -free convergiram para 20.4 e 27.7%, respectivamente.

Tal como durante o processo de refinamento da forma cristalina romboédrica (DFXr) verificou-se que dois máximos de densidade persistiram nos mapas $2|F_o| - |F_c|$ e $|F_o| - |F_c|$. No entanto, um deles foi observado na vizinhança do átomo de ferro pertencente ao centro II apenas num dos monómeros, nomeadamente no monómero B. Tendo em conta a persistência dos motivos anteriormente descritos (ver subcapítulo IIA.5.2.2.), também neste caso à semelhança do que foi efectuado para o refinamento da DFXr, este máximo foi atribuído e refinado como um ligando cianeto e um átomo de ferro pertencentes a um ião hexacianoferrato com ocupação de cerca de 40%, considerando parâmetros de vibração térmica idênticos ao do átomo de ferro II. Entre os dois monómeros permaneceu uma esfera de densidade com intensidade dupla da em média atribuída a uma molécula de água. A sua vizinhança é semelhante à descrita para a estrutura determinada para os cristais romboédricos, por isso este máximo de densidade foi também atribuído a um ião cálcio.

Como é visível na figura IIB.3., os mapas de densidade electrónica na zona da cadeia lateral da Met45 sugerem, tal como na forma cristalina romboédrica, a sua mutação para um resíduo de leucina. Esta foi efectuada e incluída no processo de refinamento.

A variação dos factores R e R -free durante o processo de refinamento, utilizando o conjunto de reflexões com resolução máxima de 2.15 Å, está representada na figura IIB.4. No último ciclo de refinamento foi utilizado o conjunto total de reflexões não tendo sido verificadas alterações quer no modelo quer no valor do factor R , o que

permitiu concluir que a exclusão das reflexões utilizadas para o cálculo do *R-free* não afectou o resultado final do processo de refinamento.

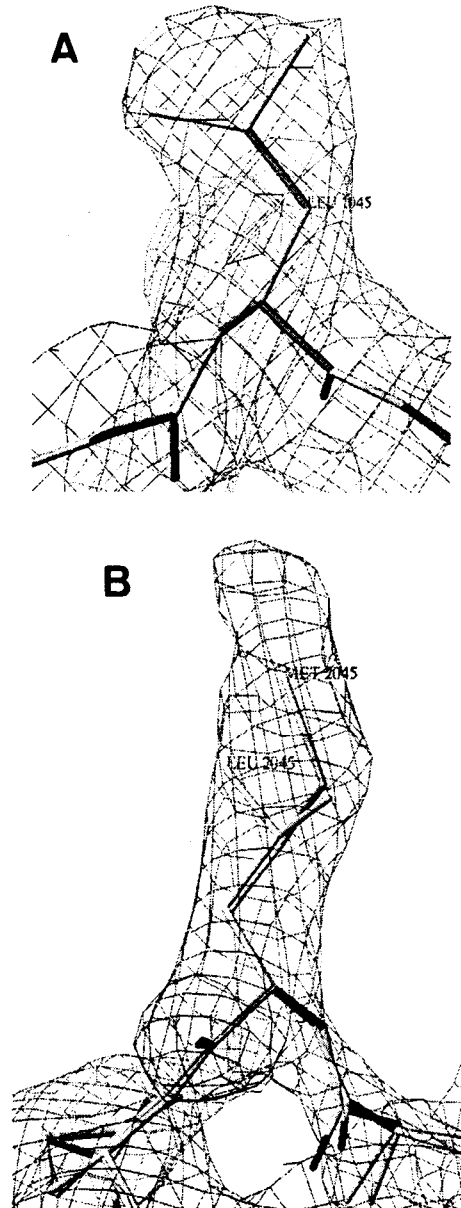


Figura IIB.3. Densidade electrónica $2|F_o|-|F_c|$ (1.0σ) para a cadeia lateral da leu45 **A)** no monómero A e **B)** no monómero B. Para este monómero está representada em sobreposição a cadeia polipeptídica antes de ter sido considerada e refinada a mutação da met45 por uma leucina.

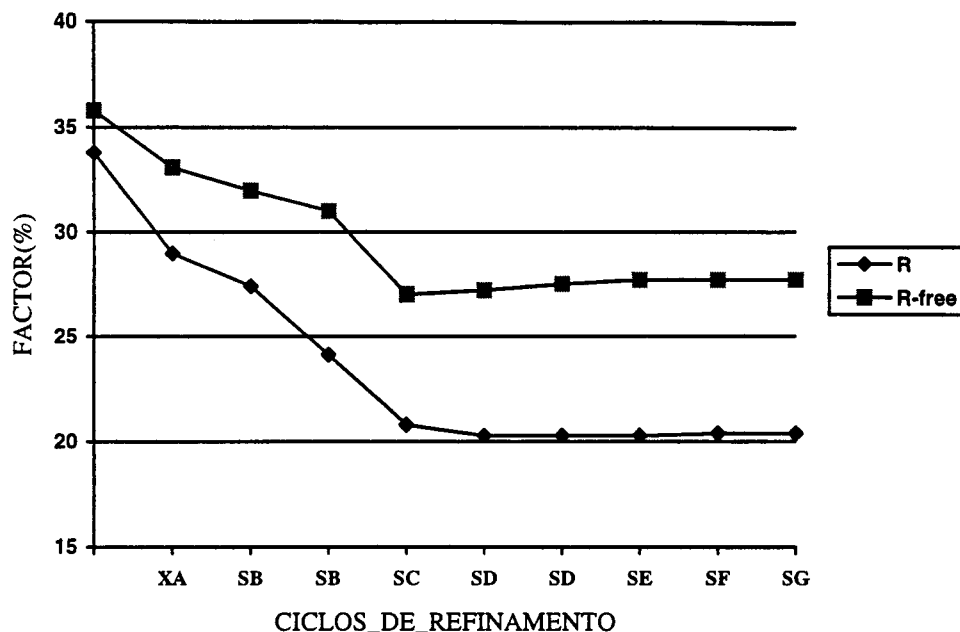


Figura IIB.4. Variação dos factores *R* e *R-free* ao longo do processo de refinamento utilizando o conjunto de dados com resolução máxima de 2.15 Å. Os ciclos de refinamento efectuados com o programa XPLOR estão identificados com X e os efectuados com o programa SHELX-93 estão identificados com S. A segunda letra identifica o protocolo de refinamento utilizado: A, refinamento de “têmpera” simulada, do B global, de B por grupos (cadeia principal e cadeia lateral para cada resíduo) e de B individuais; B, refinamento de mínimos quadrados; C, igual a B excluindo reflexões com $F < 1\sigma(F)$; D, igual a C com adição de moléculas de solvente; E igual a D com adição do ião hexacianoferrato; F igual a E com adição de ião cálcio; G igual a F com mutação de Met45 para leucina.

Na tabela IIB.5 estão resumidos os parâmetros estatísticos para o refinamento da DFX na forma cristalina monoclinica (DFXm).

Tabela IIB.5. Estatística para o processo de refinamento.

Parâmetros	
Número de resíduos	250
Número de átomos (excluindo átomos de hidrogénio)	1890
Número de moléculas de água incluídas	82
Intervalo de resolução (Å)	20.0-2.15
Factor <i>R</i> ($F > 4\sigma(F)$; $F > \sigma(F)$)* (%)	19.6; 20.4
Número de reflexões	12956
Factor <i>R-free</i> ($F > 4\sigma(F)$; $F > \sigma(F)$) (%)	26.5; 27.7
Número de reflexões	687
Factor $R = \frac{\sum_{hkl} F_{obs} - F_{calc} }{\sum_{hkl} F_{obs} }$	

2.3. Avaliação da qualidade do modelo final

O modelo final inclui por monómero 125 aminoácidos e 2 átomos de ferro, foram ainda adicionadas por molécula de DFX 82 moléculas de água, um ião hexacianoferrato apenas com um ligando cianeto e um ião cálcio situado entre os dois monómeros. Os valores dos parâmetros usados para estimar a qualidade do modelo final são apresentados na tabela IIB.6.

Tabela IIB.6. Avaliação da qualidade do modelo final

Parâmetros	Monómero A	Monómero B
Factor de vibração térmica médio (\AA^2):		
Átomos da cadeia principal	32.6	32.1
Átomos das cadeias laterais	36.3	36.0
Átomos pertencentes aos centros metálicos (I;II)	24.8;33.5	29.0;30.0
Moléculas de água	34.8	-
Ligandos do ião cálcio	26.9	-
Número de átomos com factor de ocupação zero	36	27
Número de moléculas de água com ocupação 0.5	14	-
Desvios quadráticos médios em relação		
Comprimentos de ligação (\AA)	0.02	0.02
Ângulos de ligação ($^\circ$)	1.6	1.6
Ângulos de torsão ($^\circ$) (não restringidos)	29.5	30.1
Ângulos de planaridade ($^\circ$)	1.1	1.1
Curva de Ramachandran		
Resíduos em regiões mais favoráveis (%)	89.0	92.3
Resíduos em regiões permitidas (%)	11.0	6.7
Resíduos em regiões menos favoráveis (%)	0	1.0
Resíduos em regiões não permitidas (%)	0	0
Outros indicadores da qualidade estrutural:		
Número de maus contactos	0	0
Desvio do ângulo Omega médio em relação a valor ideal ($^\circ$)	5.2	4.9
Desvio do ângulo Zeta médio em relação a valor ideal ($^\circ$)	1.5	1.5
Factor G total (estruturas com a mesma resolução nominal)	0.0	0.0
Erro médio das coordenadas (\AA)*:		
Segundo Cruickshank	0.283	-
Baseado no valor de <i>R-free</i>	0.237	-

*ver considerações no subcapítulo IIA.5.2.3.

A única região do modelo para a qual não foi obtida densidade electrónica contínua corresponde à zona exposta ao solvente desde o resíduo Ser40 até ao resíduo Gly43 do monómero A (ver figura IIB.5A). Na mesma zona do monómero B existe densidade electrónica contínua, no entanto, possivelmente devido as restrições impostas pela presença de simetria não cristalográfica, o ajuste do modelo refinado a essa densidade não é otimizado (ver figura IIB.5B). Consequentemente, o valor médio do factor de vibração térmica considerando os átomos da cadeia principal é de 81.6 para ambos os monómeros, cerca de 2.4 vezes superior ao valor médio determinado considerando todos os átomos da cadeia principal da DFX. A análise do gráfico da variação do factor de vibração térmica médio considerando os átomos da cadeia principal para cada resíduo (figura IIB.6) mostra que, tal como na forma romboédrica, esta é a única região da cadeia polipeptídica de cada monómero em que se verifica este tipo de comportamento.

Verifica-se ainda, como seria de esperar, que para a generalidade dos resíduos o valor do factor B médio é mais elevado para os átomos da cadeia lateral relativamente ao determinado para os átomos da cadeia principal.

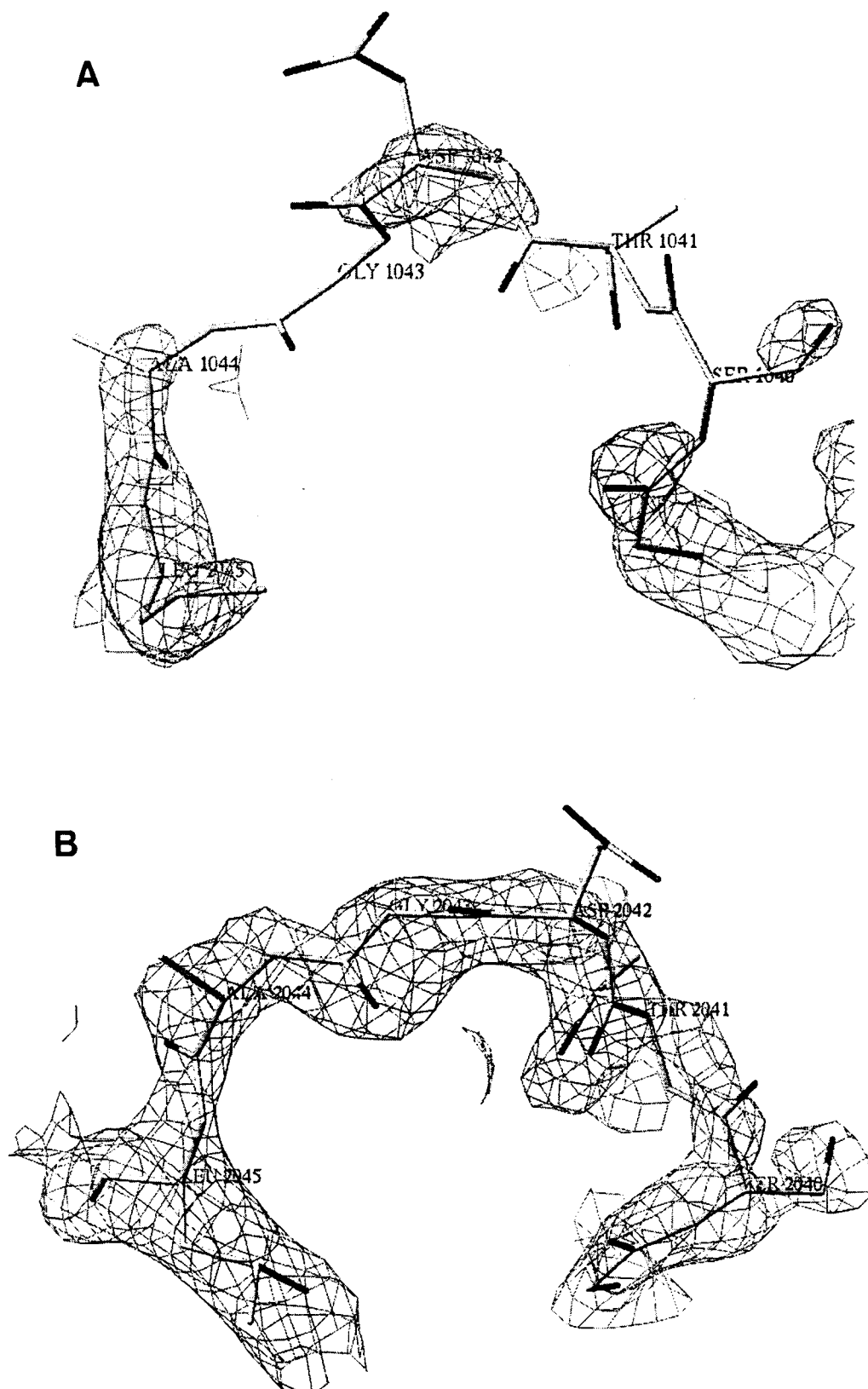


Figura IIB.5. Densidade electrónica $2|F_o|-|F_c|$ (1.0σ) para a zona Ser40-Leu45, A) no monómero A e B) no monómero B.

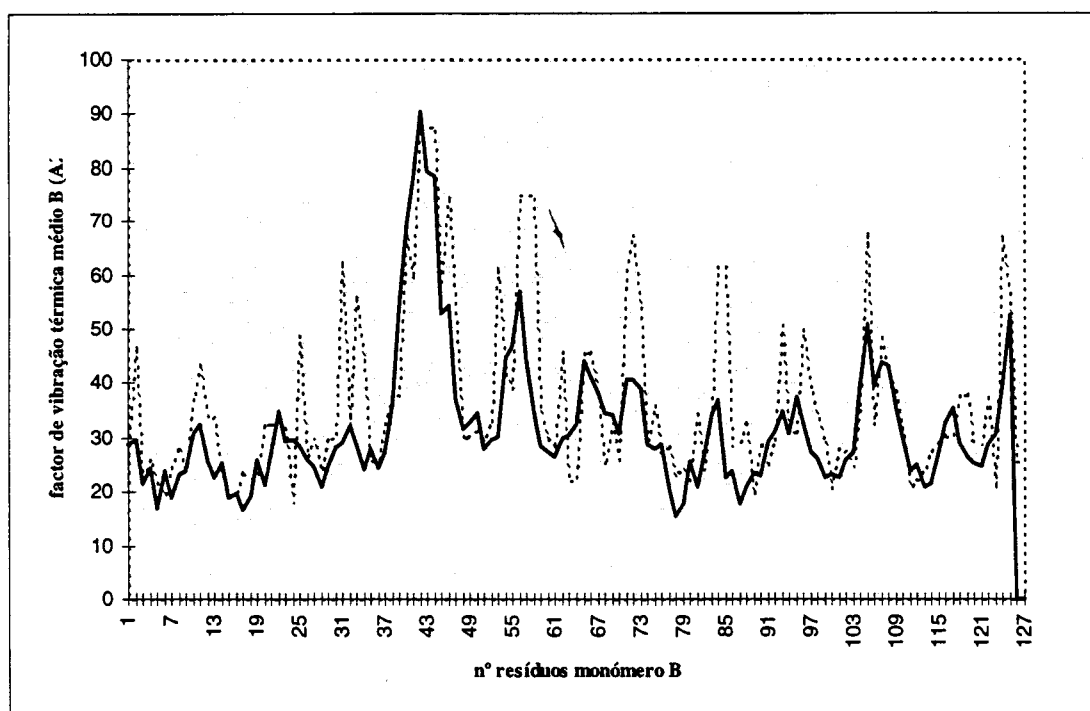
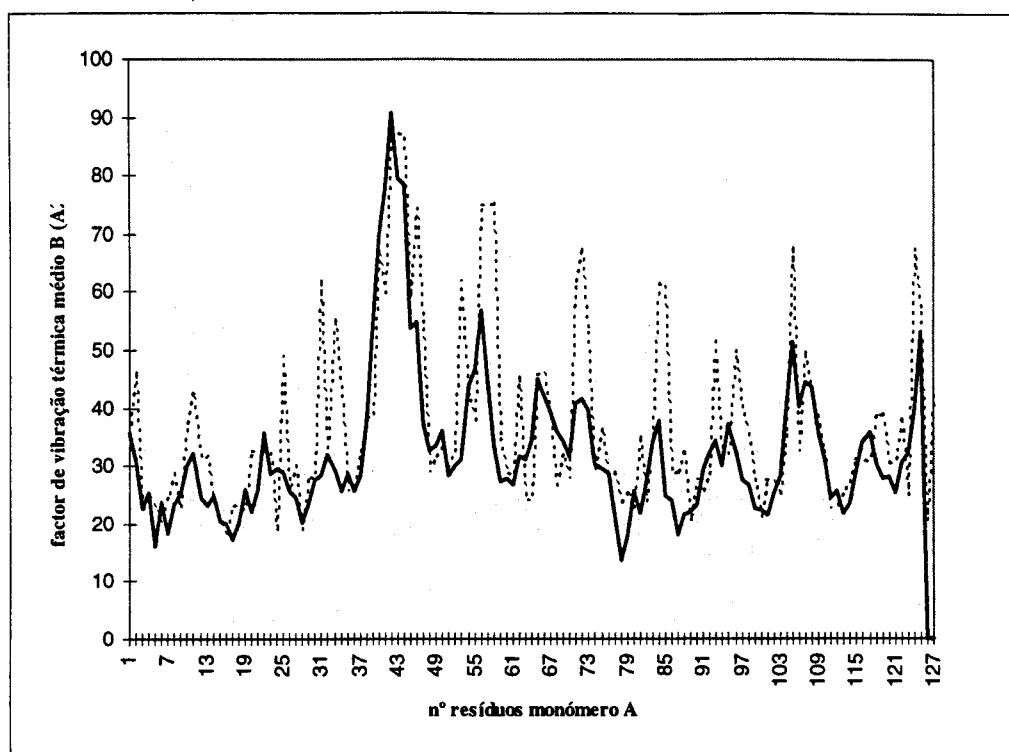


Figura IIB.6. Factores de vibração térmica isotrópicos médios para os átomos da cadeia principal (traço contínuo) e para os átomos da cadeia lateral (tracejado) para os vários resíduos dos dois monómeros (A e B) da DFX: a) (em cima) para monómero A e b) (em baixo) para monómero B.

Os factores de vibração térmica determinados para os átomos de ferro (20.6, 25.6 e 25.4 Å², respectivamente para o centro I do monómero A e para os centros I e II do monómero B) são semelhantes aos valores médios calculados para os seus ligandos o que está de acordo com a ocupação total atribuída a estes iões. No entanto, para o átomo de ferro do centro II do monómero A verifica-se que o factor de vibração térmica (42.0 Å²) é significativamente superior ao valor determinado para os outros átomos de ferro na estrutura e ao valor médio calculado para os seus ligandos. Este facto poderá ser uma indicação de que o valor da ocupação para este átomo é inferior a 100%. Na realidade, atribuindo a esse ião um parâmetro de vibração térmica idêntico aos calculados para os outros átomos de ferro obtém-se um valor refinado para o factor de ocupação de cerca de 60%.

A densidade para as cadeias laterais dos resíduos Asp42, Val51, Lys54, Lys62, Lys73 e Lys108 do monómero A e dos resíduos Glu25, Thr41, Asp42, Lys47, Lys54, Asp56, Glu72 e Lys108 do monómero B está total ou parcialmente ausente, sendo zero o valor do factor de ocupação atribuído a estes átomos.

Os traçados dos gráficos de Ramachandran [97] representados na figura IIB.7 mostram que apenas um resíduo ocupa uma zona correspondente a conformações energeticamente menos favoráveis, Asp84 do monómero B. Tal como já foi descrito para a estrutura determinada nos cristais romboédricos, este resíduo está localizado numa volta tipo gancho de cabelo (*β-hairpin loop*). No monómero A, a orientação dos átomos dos resíduos terminais desta volta envolvidos no estabelecimento das pontes de hidrogénio não é óptima, não obrigando à distorção da geometria do resíduo Asp84.

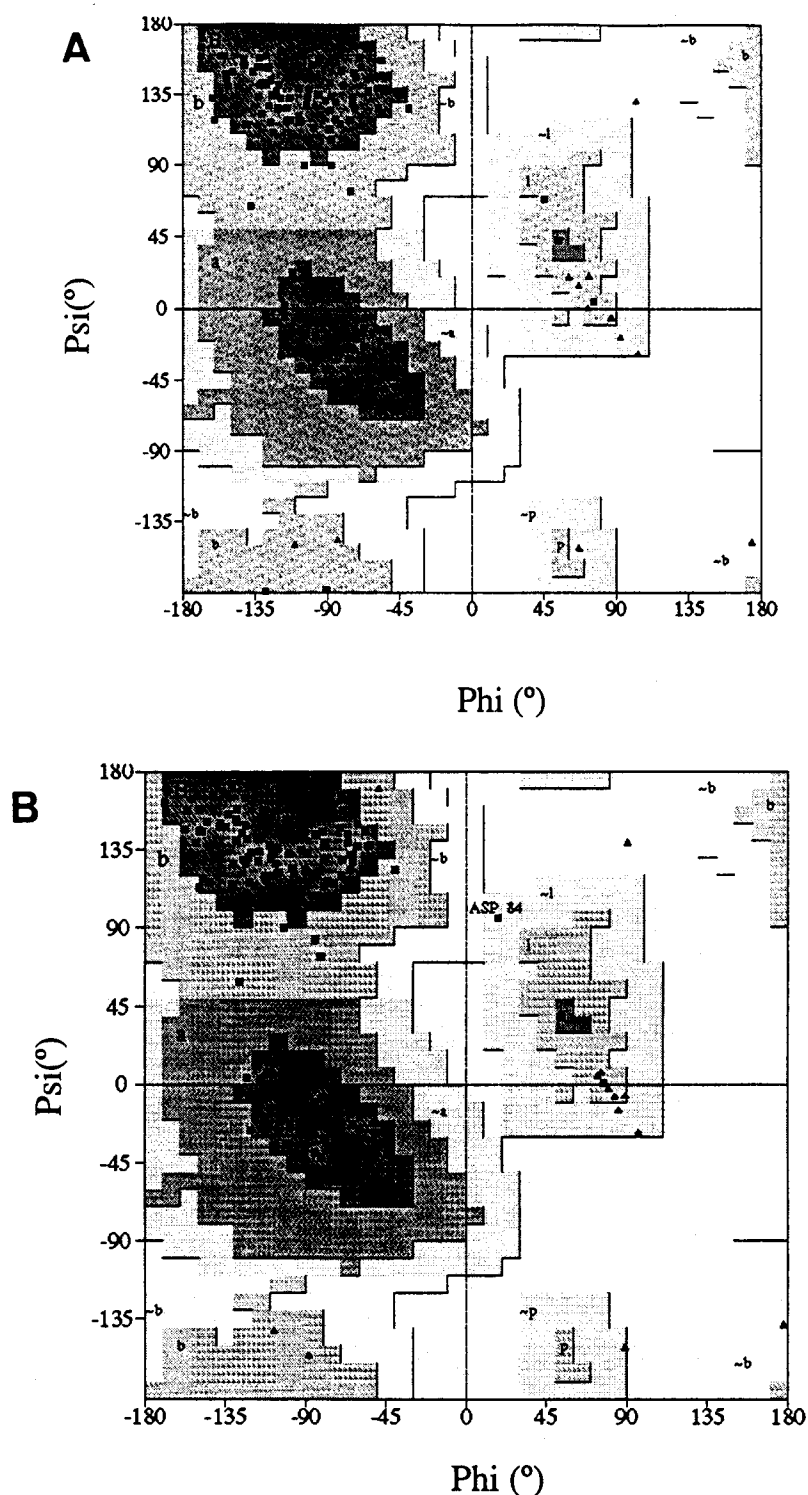


Figura IIB.7. Representação gráfica da distribuição dos ângulos de torção, ϕ e ψ , para todos os resíduos de aminoácidos, à exceção dos terminais da cadeia, na estrutura refinada da desulfoferrodoxina (gráfico de Ramachandran) **A**) no monómero A e **B**) no monómero B. Os resíduos de glicina estão representados por triângulos e os restantes resíduos por quadrados. A sombreado estão representadas as zonas favoráveis para os diferentes tipos de estrutura secundária, correspondendo a região mais escura à conformação mais favorável para cada tipo de estrutura secundária: A-hélice α com enrolamento à direita, B-folha β , L- hélice α com enrolamento à esquerda e P-epsilon. Gráfico traçado com o programa PROCHECK [94].

A resolução máxima e a qualidade dos dados de difracção recolhidos para os cristais monoclinicos são inferiores às obtidas para os recolhidos de cristais da forma romboédrica. Estes factos justificam a qualidade inferior da estrutura obtida quer em termos estereoquímicos quer em termos da localização de alguns átomos, nomeadamente das cadeias laterais de alguns resíduos e de moléculas de água. O número de moléculas de água localizadas na forma monoclinica é de 41 por monómero consideravelmente inferior ao obtido para a forma cristalina romboédrica (71 moléculas de água). Verificou-se ainda que a diminuição das restrições devido à presença de simetria não cristalográfica na unidade assimétrica implicavam uma degradação da qualidade estereoquímica do modelo, sem uma melhoria dos factores R e R -free. A imposição destas restrições reflecte-se na semelhança entre a estrutura dos dois monómeros. No entanto, tendo em conta os vários tipos de análise a que o modelo refinado foi submetido pode concluir-se que a estrutura está bem determinada, sendo a precisão obtida para as coordenadas atómicas aproximadamente 0.28 Å, a sua qualidade estereoquímica é boa, conforme foi avaliado pelo factor G e apresenta uma boa concordância com os dados de difracção ($R=20.4\%$).

C. Comparação de mapas de densidade electrónica obtidos para cristais no estado oxidado e no estado semi-reduzido

1. Materiais e Métodos

Com o objectivo de verificar se existem e de determinar quais as diferenças estruturais entre os dois estados de oxidação da DFX (estado oxidado e estado semi-reduzido) foram calculados mapas de diferença de Fourier utilizando os dados de difracção recolhidos para cristais crescidos na presença de hexacianoferrato de potássio e recolhidos para cristais crescidos na presença de ascorbato de sódio. O hexacianoferrato de potássio é um agente oxidante capaz de promover a oxidação do centro II, enquanto que o ascorbato de sódio funciona como um agente redutor do mesmo centro. Foram utilizado dois conjuntos de dados de difracção recolhidos para cristais crescidos na presença do agente oxidante, nomeadamente os dados de difracção medidos ao valor do comprimento de onda correspondente ao patamar de absorção do ferro (até à resolução de 2.5 Å) e o conjunto da dados com a resolução máxima de 1.9 Å. As intensidades indexadas foram colocadas na mesma escala pelo programa SCALEIT [61]. Foram calculados quatro tipos de mapas de diferença de

Fourier com o programa FFT [61], utilizando como coeficientes de Fourier as diferenças entre as amplitudes dos factores de estrutura observados para os cristais obtidos na presença do agente oxidante (dados de difracção a 2.5 Å e a 1.9 Å) e as amplitudes dos factores de estrutura observados para os cristais obtidos na presença do agente redutor, $|F_{\text{oxid}}| - |F_{\text{hred}}|$. A cada conjunto de coeficientes de diferença foram associados dois tipos de ângulos de fase, os designados por experimentais, $\alpha_p(\text{exp})$ obtidos utilizando directamente o método de dispersão anómala a múltiplos comprimentos de onda, e os ângulos de fase determinados para a estrutura refinada da proteína, $\alpha_p(\text{calc})$. O formato dos quatro mapas obtidos foi convertido com o programa MAPMAN [93] e posteriormente visualizados com o programa O [90].

2. Resultados

Não foram verificadas diferenças significativas entre os mapas de diferença de Fourier calculados utilizando os valores para os ângulos de fase experimentais e os determinados a partir do modelo refinado, pelo que apenas são analisados os mapas calculados com as fases refinadas.

Os dois tipos de mapas de diferença de Fourier calculados com os dados de difracção e alta e média resolução (ver figura IIC.1 e 2, respectivamente) apresentam zonas de densidade com intensidade mais significativa em duas regiões da estrutura da proteína, ambas perto do centro de ferro II, nomeadamente em torno do referido centro metálico e na zona da volta (*loop*) 40-45. O mapa calculado utilizando o conjunto de dados de difracção recolhidos até à resolução máxima de 1.9 Å apresenta na sua globalidade um

maior nível de ruído, o que poderá ser devido ao facto de se tratar do único dos três conjuntos de dados recolhido utilizando um cristal não congelado.

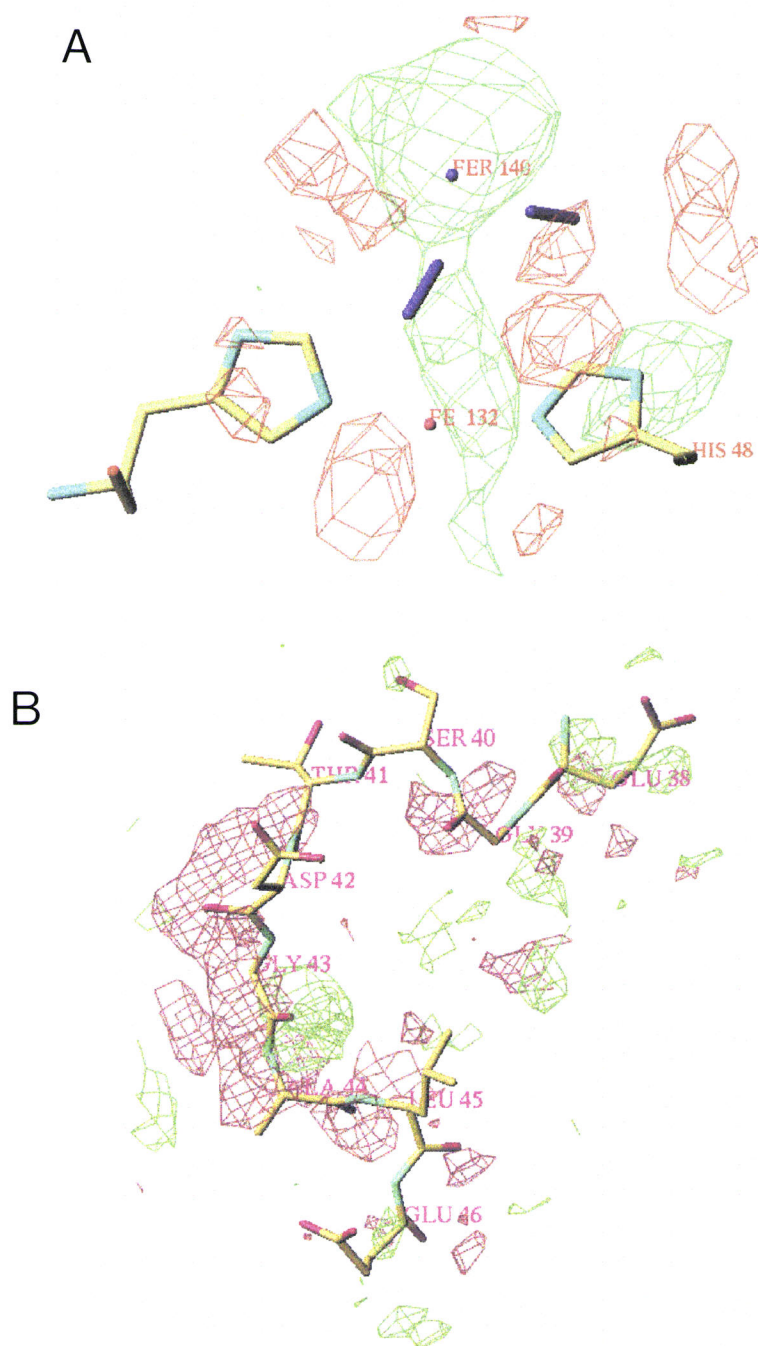


Figura IIC.1. Mapas de diferença de Fourier calculados utilizando os coeficientes $\Delta|F_{\text{oxid}} - F_{\text{hred}}|$ com contornos a a) 3.0σ e b) 2.5σ , respectivamente para a zona do centro II e para a volta 39-46. Para os cristais crescidos na presença de hexacianoferrato de potássio foram utilizados os dados de difracção recolhidos ao patamar de absorção do ferro até à resolução de 2.5 \AA

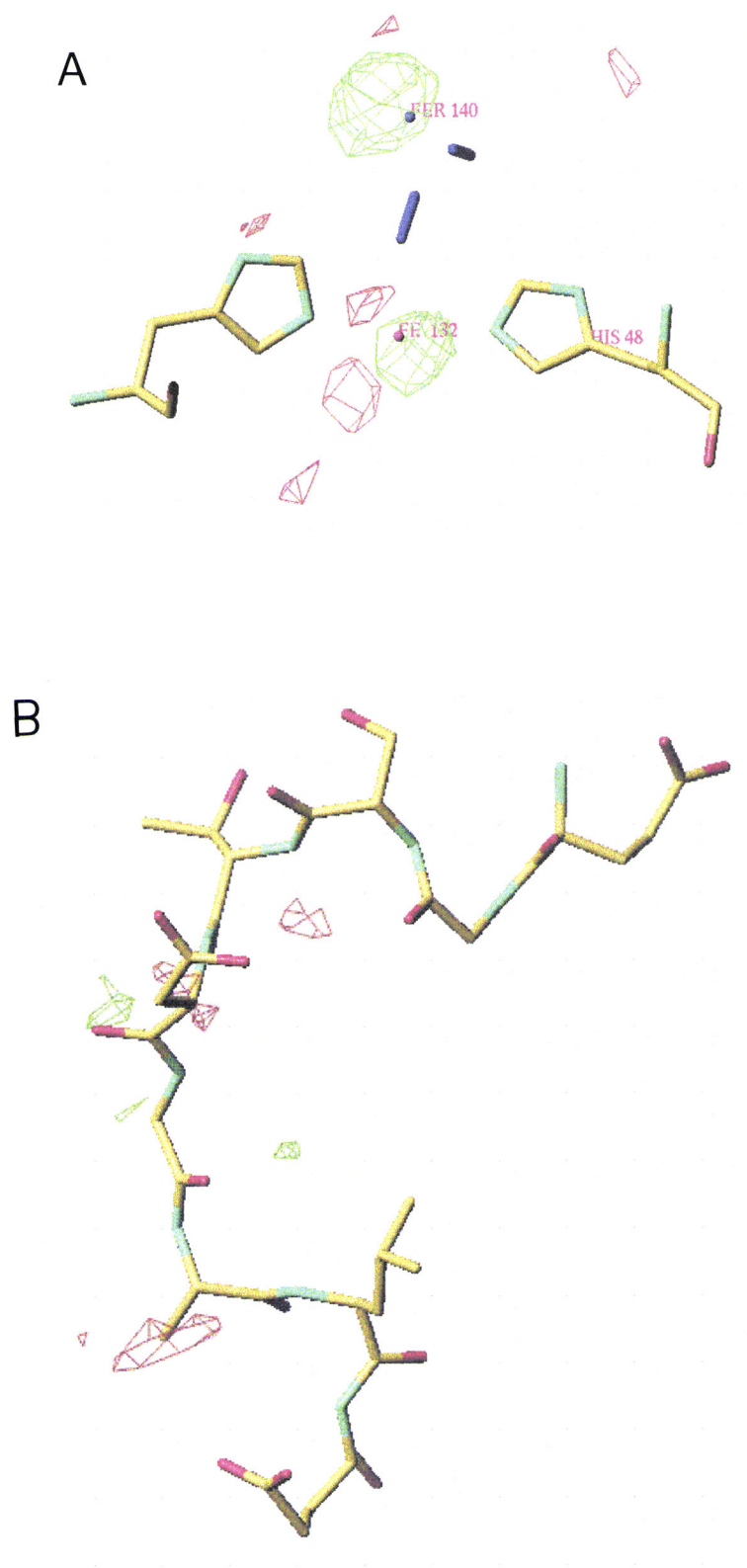


Figura IIC.2. Mapas de diferença de Fourier calculados utilizando os coeficientes $\Delta|F_{\text{oxid}} - F_{\text{hred}}|$ com contornos a **A)** 3.0σ e **B)** 2.5σ , respectivamente para a zona do centro II e para o “loop” 39-46. Para os cristais crescidos na presença de ferricianeto de potássio foram utilizados os dados difracção recolhidos até à resolução de 1.9 \AA

D. Outras determinações efectuadas utilizando cristais de desulfoferrodoxina

1. Materiais e Métodos

1.1. Determinação da massa molecular da desulfoferrodoxina

Com o objectivo de determinar a existência de agregados de massa molecular correspondente à de dímeros da DFX foram efectuadas determinações por espectrometria de massa de *electrospray* em nanofluxo de duas amostras de desulfoferrodoxina, nomeadamente, da solução de desulfoferrodoxina utilizada na preparação dos cristais (concentração 45 mg mL^{-1}) e de uma solução de concentração muito inferior (cerca de 1 mg mL^{-1}) resultante da dissolução de alguns cristais de DFX crescidos na presença de hexacianoferrato de potássio. Estes ensaios foram efectuados utilizando um espectrómetro de massa Platform II (Micromass).

As determinações referidas foram efectuadas pela Doutora Carol Robinson do Departamento de Bioquímica da Universidade de Oxford, Inglaterra.

1.2. Determinação do conteúdo em ferro e cálcio em cristais da desulfoferrodoxina

A técnica de emissão de prótons induzida por raios-X (PIXE-*proton induced X-ray emission*) permite quantificar individualmente elementos com massa atómica superior ao neon com uma sensibilidade de 1 ppm considerando o peso seco da amostra. No caso da determinação efectuada em cristais de DFX foi utilizado um feixe de prótons com uma secção de $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ com a energia de 3 MeV e um detector de Si(Li). Foram determinadas as razões Fe/S e Ca/S para cristais lavados de DFX crescidos na presença de hexacianoferrato de potássio e na presença de ascorbato de sódio. Os cristais foram lavados com uma solução 20% em PEG 4000 com o objectivo de retirar possíveis contaminantes presentes na solução de cristalização, nomeadamente ferro, enxofre e cálcio, provenientes respectivamente do hexacianoferrato de potássio, do tampão HEPES e do cloreto de cálcio. A presença nos cristais de uma quantidade vestigial de cloro (contaminante proveniente do cloreto de cálcio) serviu como prova de que a sua lavagem foi efectuada de um modo eficiente. Antes de serem expostos ao feixe de prótons os cristais foram colocados em finas folhas de Parafilme.

As determinações descritas foram efectuadas pela Doutora Elspeth Garman do Laboratório de Biofísica Molecular da Universidade de Oxford, Inglaterra.

2. Resultados

2.1. Determinação da massa molecular da desulfoferrodoxina

Para a solução concentrada de DFX foi obtida uma massa de 27982 Da e para a solução de DFX obtida por dissolução de alguns cristais foi determinado um valor de 13967 Da. Estes valores foram comparados com os valores calculados tendo em conta a massa molecular determinada para o monómero da DFX por B. Devreese *et al* [32] utilizando o mesmo método (13882 Da), a presença de dois átomos de ferro por monómero e as desprotonações que ocorrem nas cadeias laterais dos resíduos de cisteína e dos resíduos de histidina coordenados nos dois centros de ferro. Os valores determinados considerando a existência de agregados diméricos ou de monómeros são, respectivamente de 27970 e de 13985 Da. O primeiro valor é inferior em 12 unidades relativamente ao valor agora determinado e o segundo é superior em 18 unidades.

2.2. Determinação do conteúdo em ferro e cálcio em cristais da desulfoferrodoxina

Na tabela IID.1 são apresentados os valores das razões Fe/S e Ca/S previstos de acordo com a estrutura determinada para a DFX, considerando nove átomos de enxofre, dois átomos de ferro e um íão cálcio por monómero, assim como as mesmas razões obtidas experimentalmente para cristais crescidos na presença de um agente oxidante e de um agente redutor.



Tabela IID.1. Resultados experimentais e previsões efectuadas para as razões de Fe/S e Ca/S em cristais de DFX.

Cristais obtidos na presença de	Razão Fe/S		Razão Ca/S	
	Experimental	Prevista	Experimental	Prevista
Hexacianoferrato de potássio	0.24	0.25 ^a	0.15	0.06
Ascorbato de sódio	0.12	0.22	0.06	0.06

^a Foi considerada uma ocupação de 30% para átomo de ferro pertencente ao ião hexacianoferrato.

III. ANÁLISE E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

A. Descrição e Análise da Estrutura Refinada da Desulfoferrodoxina Isolada de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 [80]

1. Aspectos gerais da estrutura da DFX

A molécula da DFX é um homodímero formado por dois monómeros relacionados por um eixo binário cristalográfico. Na figura IIIA.1 está representada a cadeia polipeptídica, respectivamente, com o eixo binário ao longo do plano e perpendicular ao plano do papel. As dimensões máximas aproximadas da molécula são $50 \times 47 \times 25 \text{ \AA}^3$.

Cada monómero é constituído por dois domínios, contendo dois centros de ferro não-hémicos diferentes. No entanto, optou-se por descrever a estrutura do homodímero com uma organização em dois domínios, I e II, cada um contendo dois centros não-hémicos de ferro. Esta escolha tem vantagens devido à elevada homologia estrutural do domínio I com a molécula de desulforedoxina isolada de *D. gigas* (DX). Deste modo, os centros de ferro pertencentes ao mesmo domínio estão relacionados por simetria cristalográfica, apresentando coordenação diferente os átomos de ferro

pertencentes a domínios diferentes. Serão denominados centro I e II, ou átomos de ferro I e II, de acordo com o domínio a que pertencem.

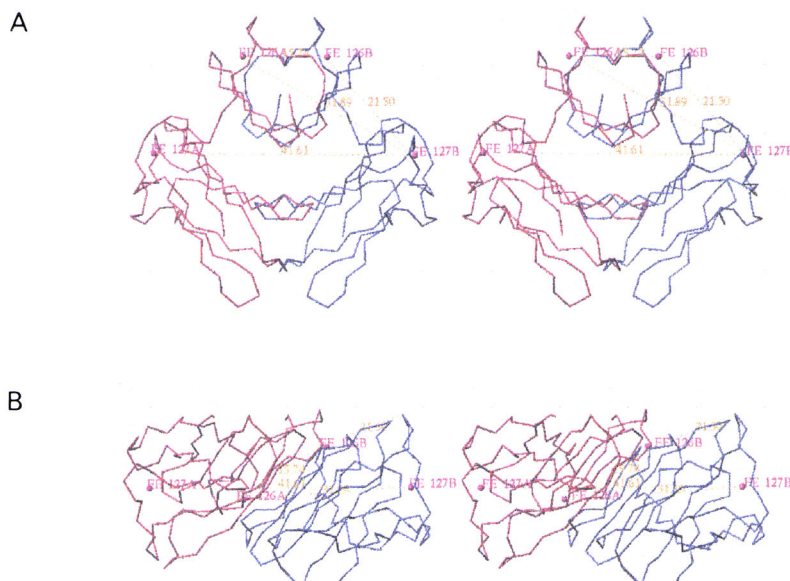


Figura III.A.1. Traçado da cadeia polipeptídica para o dímero da DFX, onde um monómero está representado a vermelho e o outro a azul, os átomos de ferro estão representados a magenta. Estão também representadas as distâncias entre átomos de ferro, 15.8 Å para o domínio I, 41.6 Å no domínio II e 31.9 Å entre domínios. Na figura **A**) o dímero está orientado com o eixo binário ao longo do plano do papel e na figura **B**) o mesmo eixo está perpendicular ao plano do papel.

O domínio I tem uma forma aproximadamente esférica sendo a sua estrutura muito semelhante à da DX, pelo que será denominado domínio tipo-DX. O domínio II apresenta uma forma alongada estendendo-se na direcção normal ao eixo binário cristalográfico. Os dois domínios estão ligados por uma região de cadeia polipeptídica estendida permitindo a formação de uma cavidade alongada no interior da molécula com um volume de van der Waals aproximado de 430 Å³ (cálculos efectuados com o programa VOIDOO [103]).

Os átomos de ferro encontram-se à superfície da molécula acessíveis ao solvente. As suas posições na molécula assim como as distâncias entre elas podem ser visualizadas na figura IIIA.1.

Pode considerar-se que a estrutura secundária está organizada em quatro níveis de folhas β antiparalelas aproximadamente paralelas entre si, estendendo-se três delas ao longo do dímero, como é facilmente observável na figura IIIA.2.

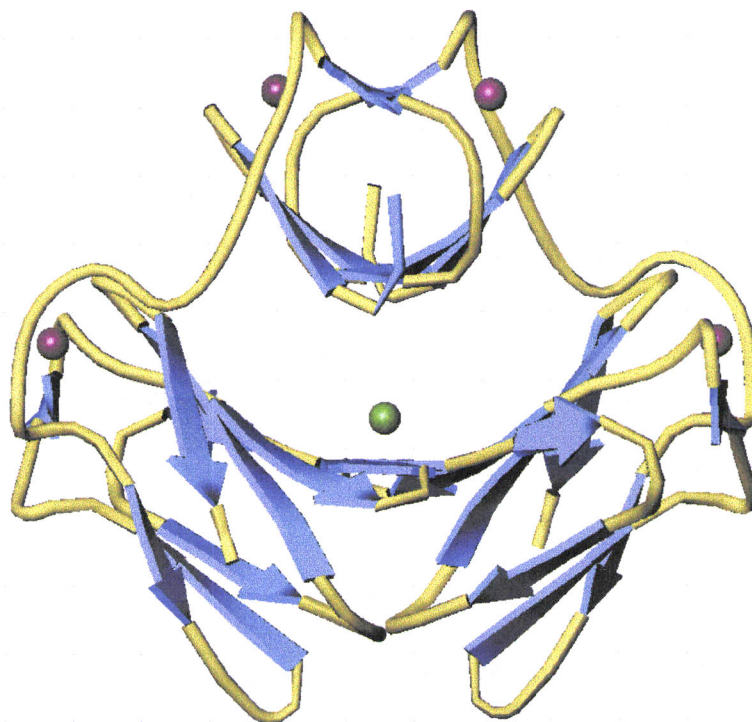


Figura III.A.2. Representação da estrutura secundária do dímero da DFX, a cadeia polipeptídica está representada a azul para as fitas β e a amarelo para as zonas de enrolamento aleatório. Os átomos de ferro estão representados a magenta e o íon cálcio na região interdomínios a verde. É evidente a presença dos dois domínios diméricos, neste caso orientados com o eixo binário ao longo do plano do papel, onde o domínio superior é o domínio I e o inferior é o domínio II e a organização da estrutura secundária em quatro níveis de folhas β .

As moléculas de solvente definidas na estrutura estão predominantemente distribuídas à superfície da molécula, apresentando-se apenas algumas em zonas mais internas da estrutura nomeadamente, perto do centro I, na interface dos dímeros e na região interdomínios.

2. A estrutura secundária e terciária do monómero

Um diagrama do monómero da DFX onde é salientada a sua estrutura secundária está representado na figura IIIA.3. O terminal amino é constituído por 34 resíduos de aminoácidos, formando o domínio monomérico do tipo-DX; o terminal carboxilo é constituído por 84 resíduos podendo a sua estrutura terciária ser classificada como uma *sandwich*- β constituída por duas folhas β antiparalelas, uma com quatro e outra com três fitas. A primeira fita β deste domínio é imediatamente antecedida por um pequeno segmento de hélice. Os dois domínios estão ligados por um região de cadeia polipeptídica estendida formada por 7 resíduos.

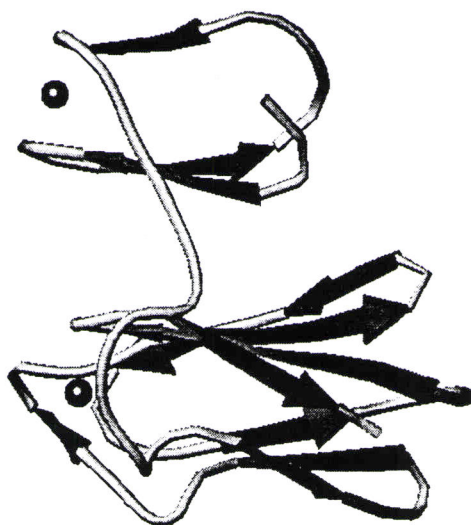


Figura III.A.3. Representação da estrutura secundária do monómero da DFX. As fitas β estão representadas por setas e os átomos de ferro por esferas. O domínio superior é o domínio monomérico do tipo DX que contém o terminal-N e o inferior contém o terminal carboxilo.

Um esquema da topologia do monómero da DFX está representado na figura IIIA.4A.

O alinhamento de sequências entre DFX e a DX está representado na figura IIIA.4B, onde para cada uma das proteínas estão assinalados os elementos de estrutura secundária e os resíduos que coordenam os centros de ferro. O tipo e a localização na

sequência dos elementos de estrutura secundária determinados utilizando o programa PROCHECK são idênticos para as duas proteínas, sendo apenas de salientar o facto da fita $\beta 2b$ ter metade da extensão da fita β correspondente na molécula de DX. Para ambas as moléculas pode ser considerada a existência, a seguir à fita $\beta 1$, de dois pequenos segmentos de estrutura β .

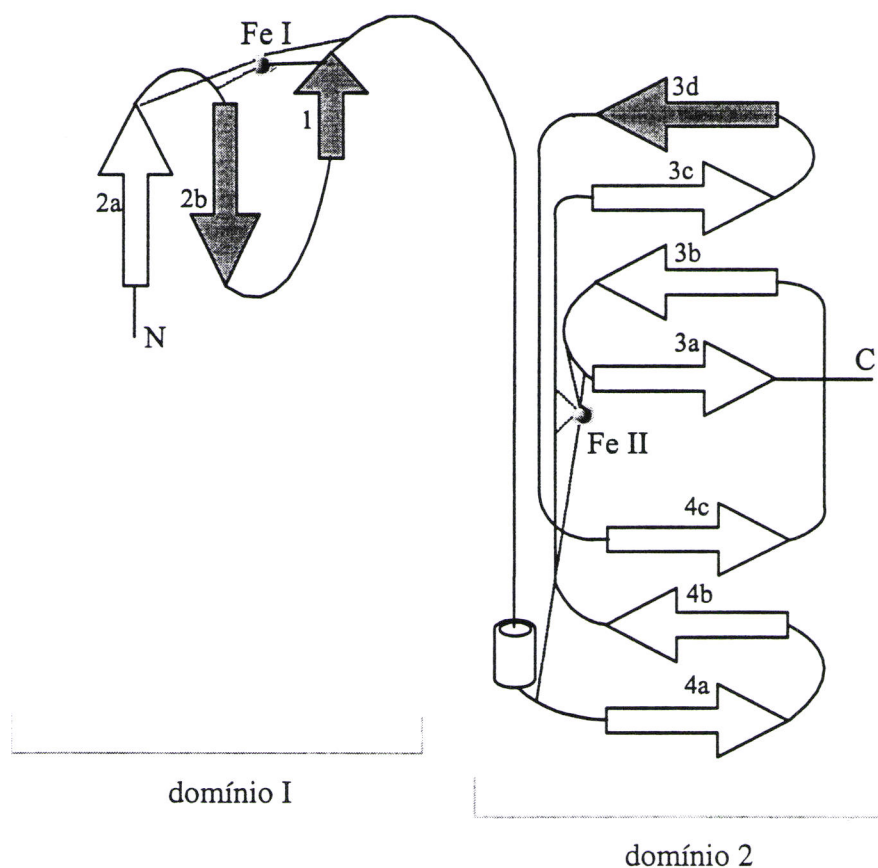


Figura III.A.4.A Diagrama de topologia para o monómero da DFX. As setas a cheio representam as fitas β que interactivam com as relacionadas por simetria do segundo monómero. As esferas representam os átomos de ferro.



Figura III.A.4B. Alinhamento das seqüências de aminoácidos e identificação da estrutura secundária para a DX (1) e DFX (2).

A maioria dos resíduos que contribuem com ligandos para os dois centros de ferro não estão incluídos em zonas de estrutura secundária do tipo folha β ou hélice α , mas pertencem a voltas em gancho de cabelo (“ β hairpins loops”) ou zonas de conformação atípica. Para o centro I só a Cys28, um dos quatro ligandos, pertence à folha β 1, enquanto que para o centro II só a His48, um dos cinco ligandos, está incluído num pequeno segmento de hélice α .

Os resíduos Val63 e Gly64 estabelecem uma ligação peptídica com conformação *cis* a que corresponde um ângulo Ω igual a 355.4° (figura IIIA.5). Quando o segundo resíduo envolvido na ligação peptídica não é uma prolina este tipo de conformação é energeticamente mais desfavorável que a conformação *trans*, devido a obrigar a uma elevada proximidade entre os átomos de carbono α e as cadeias laterais dos resíduos envolvidos na ligação. Apenas cerca de 0.05% das ligações peptídicas observadas em proteínas globulares surgem na conformação *cis* [104].

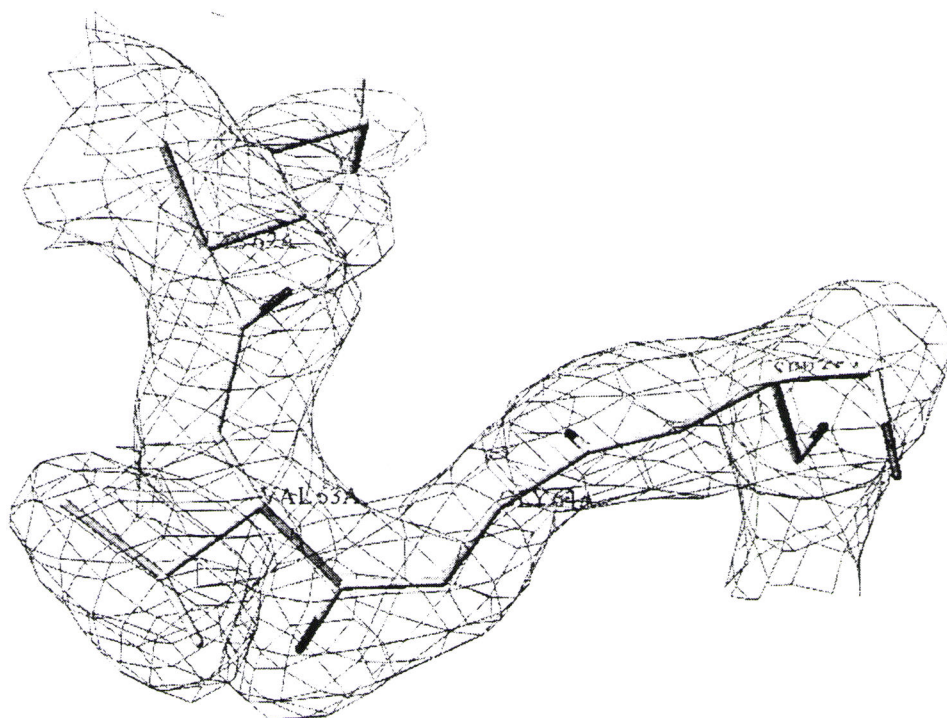


Figura III.A.5. Cadeia polipeptídica e densidade electrónica $2|F_o|-|F_c|$ (1.0σ) para os resíduos Val63 e Gly64 evidenciando a conformação *cis* para a ligação péptida estabelecida entre eles.

3. Domínio I, tipo-DX

A estrutura terciária global do domínio I da DFX é muito semelhante à do dímero da DX. O desvio quadrático médio para a sobreposição das duas estruturas, considerando os átomos da cadeia principal, é de 0.59 \AA . A sobreposição das duas moléculas está representada na figura IIIA.6A. Apenas para a volta 20-26 que contém três resíduos de glicina consecutivos, se verifica uma diferença conformacional significativa, sendo o desvio máximo entre átomos equivalentes nas duas estruturas de 3 \AA . Esta diferença conformacional entre as duas estruturas pode ser visualizada na figura IIIA.6B.

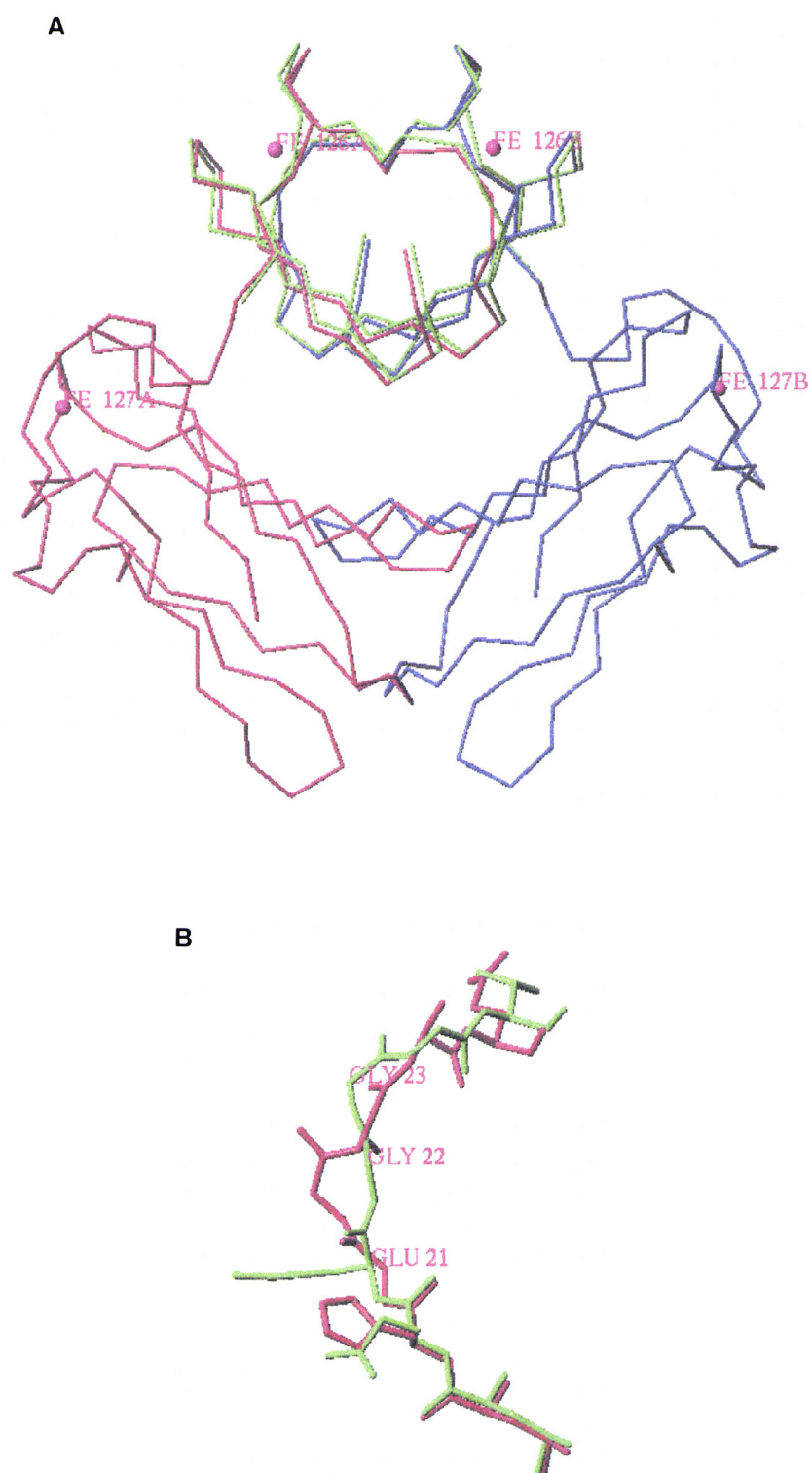


Figura III.A.6 A) e B) Representação da cadeia polipeptídica da DFX (os monómeros estão representados a azul e a vermelho) com sobreposição do seu domínio I com a estrutura da DX (representada a verde). Os átomos de ferro estão representados a magenta. Na figura 6B), mostra-se a sobreposição das duas estruturas na zona em que é maior a sua diferença conformacional, zona Glu21-Gly23.

Três fitas β de cada monómero ($\beta 1$, $\beta 2a$ e $\beta 2b$) contribuem para as duas folhas β aproximadamente paralelas, conferindo ao domínio uma estrutura em barril- β incompleto [31] (ver figura IIIA.2). A zona interior do barril- β é predominantemente hidrofóbica, como é usual neste tipo de organização estrutural.

Os centros de ferro do domínio I apresentam, tal como na DX, uma coordenação tetrahédrica distorcida por quatro átomos de enxofre pertencentes a quatro resíduos de cisteína, Cys9, Cys12, Cys28 e Cys29. A figura IIIA.7A mostra a estrutura secundária da proteína e as cadeias laterais dos resíduos com os átomos de enxofre ligados ao centro metálico e a figura IIIA.7B mostra a coordenação e a densidade electrónica em torno do centro I. A distância entre os dois átomos de ferro no domínio I é de 16 Å, idêntica à determinada para a DX. Duas das cisteínas ligadas ao ferro, Cys9 e Cys12, contribuem para o motivo, Cys-X-X-Cys, normalmente denominado articulação (*knuckle*) tipo-rubredoxina [105], apresentando uma estrutura e padrão de pontes de hidrogénio característicos. O facto dos outros dois resíduos de cisteína ligados ao centro I, Cys28 e Cys29, ocuparem posições consecutivas na sequência contribui para a distorção da geometria tetraédrica do centro metálico.

Na tabela IIIA.1 são listados os comprimentos e ângulos de ligação em torno do átomo de ferro para o centro I da DFX e os valores equivalentes para a DX e rubredoxina (Rb). As distâncias ferro-enxofre são semelhantes nas três moléculas e os ângulos de ligação mostram a mesma distorção da geometria na DFX e na DX, sendo o ângulo envolvendo as cisteínas adjacentes ligeiramente superior.



Figura III.A.7. Representação do centro I. O átomo de ferro I está representado a magenta **A)** os ligandos do centro I, coloridos de acordo com o tipo de átomo, estão incluídos em “loops” ou zonas próximas destes. O resto da cadeia polipeptídica é representada a vermelho; **B)** representação da densidade eletrónica $2|F_o|-|F_c|$ (1.0σ) para o centro I; **C)** os resíduos His11 e Asn14, coloridos de acordo com o tipo de átomo, têm as suas cadeias laterais posicionadas a menos de 6 Å do átomo de ferro I. Os ligandos do centro I e restante cadeia polipeptídica estão representados a azul.

Tabela IIIA.1. Comprimentos e ângulos de ligação em torno do centro I de ferro na DFX e valores equivalentes na DX e na Rb.

Comp. ligação Fe-S _{cys} (Å)	DFX	DX ^a	Rb ^b
9	2.3	2.3-2.3	2.3-2.3
12	2.3	2.3-2.4	2.3-2.3
28	2.3	2.3-2.7	2.3-2.3
29	2.3	2.2-2.3	2.2-2.3
Ângulos ligação S _{cys} -Fe-S _{cys} (°)			
9-12	110	109-110	111-115
9-28	106	107-108	111-113
9-29	106	108-110	105-106
12-28	104	102-104	101-104
12-29	105	104-105	109-114
28-29	126	120-126	112-113

^a Valores para os dois monômeros na molécula da DX.

^b Intervalo de valores para as três estruturas de Rb isoladas da espécie *Desulfovibrio*.

A Tyr7 é o único resíduo aromático presente na DX. Este resíduo conservado nas sequências da DX, DFX e Rb ocupa uma posição similar nas três estruturas. No entanto, a estrutura primária da DFX apresenta, por monômero, mais quatro resíduos aromáticos no Domínio I. A His 11 substitui a Leu11 da DX e está posicionada perto do centro metálico, sendo a distância entre o átomo Nδ1 e o átomo de ferro de 5.8 Å (ver figura IIIA.7C). As restantes três histidinas da DFX, His3, His20 e His35, substituem resíduos polares da DX, Glu3, Glu20 e Lys35. Enquanto que na DFX estes resíduos aromáticos estão localizados à superfície da molécula, na Rb verifica-se uma concentração deste tipo de resíduos no seu núcleo interior.

Apenas outro resíduo, Asn14, apresenta a sua cadeia lateral a menos de 6 Å do átomo de ferro I (a distância FeI-Asn Oδ1 é de 4.5 Å), estabelecendo pontes de hidrogénio com três das quatro cisteínas coordenadas ao centro metálico (ver figura IIIA.7C). As pontes de hidrogénio estabelecidas pelos resíduos coordenados ao átomo de ferro I

estão sumarizadas na tabela IIIA.2. Dos quatro ligandos apenas a Cys29 não estabelece interações deste tipo.

Tabela IIIA.2. Ligações por pontes de hidrogénio estabelecidas por ligandos do centro I.

			Distância na DFX (Å)	Distância aos átomos dos resíduos equivalentes na DX (Å)
Cys9	O	His11 N	3.3	3.3
		Gly13 N	3.0	3.0
	N	Asn14 O	2.8	2.8
		Sγ His11 N	3.5	3.5
Cys12	O	Asn14 N	3.6	3.5
		Thr10 O	3.9	3.8
	N	Asn14 N	3.7	4.4
		Asn14 Oδ1	3.6	5.9
Cys28	O	Gly30 N	3.2	3.3
		Glu31 N	3.1	3.2
	N	Glu31 O	3.0	3.0
		Sγ Asn14 Oδ1	3.5	3.6

O ambiente em torno dos centros de ferro do domínio I da DFX tem, tal como na DX [31], um carácter polar, que também neste caso inclui algumas moléculas de água estruturais (ver subcapítulo IIIA.5). A rede de interações por pontes de hidrogénio em torno do centro de ferro é semelhante nas duas estruturas, apenas a cadeia lateral do resíduo 14 (asparagina na DFX que substitui uma glutamina na DX) está na DX mais afastada do átomo de enxofre da cisteína 12, e conseqüentemente do átomo de ferro.

4. Domínio II

No domínio II as fitas de β3a-d de cada monómero contribuem para a formação da folha β antiparalela que se estende através da molécula, observando-se um desvio gradual entre a primeira e a oitava fita β. Na zona central desta folha β, a fita β3d

interactua com a relacionada por simetria pertencente ao outro monómero. Como mostra a figura IIIA.2, por baixo desta região e em cada monómero, quatro fitas formam folhas β antiparalelas não estabelecendo interacções entre subunidades.

O centro II de ferro está localizado entre as duas folhas β (3 e 4) à superfície da molécula e envolvido por duas voltas que contêm quatro dos seus ligandos e pela volta desordenada Ser40-Lys47. A geometria de coordenação do átomo de ferro pode ser descrita como piramidal quadrada incompleta ocupando as quatro histidinas, His48, His68, His74 e His118, as posições equatoriais e a Cys115 a posição axial. A figura IIIA.8A mostra a estrutura secundária da proteína em torno deste centro e as cadeias laterais dos seus ligandos. Este centro de ferro apresenta uma coordenação invulgar apenas por átomos de azoto e enxofre pertencentes, respectivamente a resíduos histidina e cisteína. Este tipo de coordenação apenas por átomos de azoto e enxofre foi descrito recentemente, pela primeira vez, para a nitrilo hidratase [51], porém, neste caso os átomos de azoto coordenados são fornecidos pela cadeia polipeptídica. A coordenação e a densidade electrónica em torno do átomo de ferro II pode ser visualizada na figura IIIA.8B. Na tabela IIIA.3 são apresentados alguns detalhes da geometria em torno do centro II. Todas as histidinas estão coordenadas ao ferro através do átomo Ne2, excepto a His118 que está ligada através do átomo N δ 1, o que permite uma diminuição de cerca de 1.9 Å na distância entre o átomo de ferro e o C α deste resíduo. Os átomos de azoto das histidinas estão aproximadamente no mesmo plano, enquanto que o átomo de ferro está ligeiramente deslocado na direcção do S γ da Cys115.

Tabela IIIA.3. Parâmetros geométricos para a esfera de coordenação do átomo de ferro II.

Ligandos		Comprimento de ligação (Å)		
His48 Nε2		2.2		
His68 Nε2		2.1		
His74 Nε2		2.2		
His118 Nδ		2.1		
Cys115 Sδ		2.3		
Ligandos		Ângulos de ligação X(N,S)-Fe-N(°)	Ângulos entre os planos definidos pelas cadeias laterais de histidinas em posições opostas (°)	
His48	His68	84	His48-His74	130
His68	His74	94	His68-His118	69
His74	His118	86		
His118	His48	92		
Cys115	His48	112		
Cys115	His68	95		
Cys115	His74	90		
Cys115	His118	96		
Plano de mínimos quadrados definido pelos átomos de azoto ligados ao ferro $-0.4x+0.6y-0.6z=-22.1$				
Desvios ao plano (Å)		Ângulo entre o plano e a ligação Fe-Cys115 Sγ (°)		
His48 Nε2		-0.1		
His48 Nε2		0.1		
His48 Nε2		-0.1		
His118 Nδ		0.1		
Cys115 Sγ		2.6		
Fe		0.3		

A introdução no refinamento da estrutura da DFX de um ião hexacianoferrato na sexta posição de coordenação do centro II não provocou alterações significativas na geometria de coordenação deste centro metálico. Este ião apresenta uma ocupação parcial de cerca de 34% e está ligado ao átomo de ferro II através do átomo de azoto de um dos seus seis ligandos cianeto. A figura IIIA.8C mostra a densidade electrónica

e a estrutura incompleta do ião hexacianoferato introduzida perto do centro de ferro II. O mapa de densidade electrónica $|F_o|-|F_c|$ sugere a existência de conformações alternativas para dois dos ligandos do centro II; His48 e His118, possivelmente devido à interacção estabelecida. Na tabela IIIA.4 são apresentados alguns parâmetros geométricos para a estrutura do ião hexacianoferato refinado com coordenação incompleta e para a sua interacção com o átomo de ferro II. É ainda apresentada uma lista dos átomos da proteína mais próximos do ião hexacianoferato.

Tabela IIIA.4. Parâmetros geométricos para os átomos localizados do ião hexacianoferato, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e parâmetros para a sua ligação com o centro II de ferro.

Parâmetros geométricos para o ião hexacianoferato			
Comprimento de ligação (Å)		Ângulo de ligação (°)	
C2-N2	1.2	$\text{Fe}_{\text{CN}}\text{-C2-N2}$	160
$\text{Fe}_{\text{CN}}\text{-C2}$	2.0	$\text{C1-Fe}_{\text{CN}}\text{-C2}$	90
$\text{Fe}_{\text{CN}}\text{-C1}$	2.0	$\text{Fe}_{\text{CN}}\text{-C1-N1}$	160
C1-N1	1.2		
Parâmetros geométricos para a ligação entre o ião hexacianoferato e o centro II			
Comprimento de ligação (Å)		Ângulo de ligação (°)	
FeII-N2	2.5	FeII-N2-C2	116
		$\text{N2-FeII-N}\epsilon 2$ His48	89
		$\text{N2-FeII-N}\epsilon 2$ His68	69
		$\text{N2-FeII-N}\epsilon 2$ His74	75
		$\text{N2-FeII-N}\delta 1$ His118	99
Vizinhança do ião hexacianoferato			
Átomos ião hexacianoferato		Átomos proteína	Distância (Å)
N1		His118 Nε2	3.2

O ferro constituinte do ião hexacianoferato foi identificado com Fe_{CN} .

A ligação do ião hexacianoferato ao átomo de ferro II levanta a questão da existência de um sexto ligando proteico na estrutura da proteína isolada que tenha sido removido pela adição do hexacianoferato de potássio durante a preparação do ensaio de

cristalização. O resíduo mais próximo da sexta posição de coordenação, a Lys47 encontra-se localizado num extremo da volta que apresenta densidade electrónica mal definida. No modelo actual, considerando a ocupação da sexta posição de coordenação pelo ião hexacianoferrato, a distância entre o átomo Lys47N ζ e o átomo de ferro é de 7.5 Å. No entanto, considerando outro rotamero possível para a cadeia lateral deste resíduo esta distância pode ser reduzida para 4.0 Å.

Os resíduos não coordenados e com a sua cadeia lateral localizada na proximidade do centro II, assim como as distâncias entre o átomo de ferro e o átomo mais próximo de cada resíduo, estão listados na tabela IIIA.5. O Trp121 é o único resíduo aromático nesta situação, o seu grupo indol é aproximadamente paralelo ao anel da His48, sendo a distância entre o átomo Ne1 do primeiro e o átomo C γ do segundo resíduo de 3.6 Å (ver figura IIIA.8D). O átomo Ne1 do Trp121 estabelece ainda uma ligação por ponte de hidrogénio com o oxigénio carbonílico da His118, outro resíduo histidina que coordena o centro II de ferro. As ligações por pontes de hidrogénio estabelecidas pelos ligandos do centro II de ferro estão listadas na tabela IIIA.6.

Tabela IIIA.5. Distância mínima entre o átomo de ferro II e as cadeias laterais de outros resíduos presentes na proximidade do centro II de ferro.

	Distância mínima FeII-resíduo (Å)
Pro69 C γ	5.8
Ile76 C δ 1	5.0
Asn116 O δ 1	5.7
Leu117 C β	5.0
Trp121 Ne1	6.3

Tabela IIIA.6. Ligações por pontes de hidrogénio estabelecidas por átomos dos resíduos ligados ao centro II.

Ligandos centro II	Átomos vizinhos		Distâncias (Å)
His48	O	Pro50 N	3.1
	N	Ala44 O	2.6
		Met45 O	3.4
		Ala44 O	3.4
Nδ1			
His68	O	Met70 N	3.6
	N	Val63 O	2.9
		Val66 O	3.2
His74	O	Met70 N	3.8
		Glu71 N	2.9
	N	Glu71 O	3.0
		Glu72 O	4.0
Cys115	O	Leu117 N	3.0
		Gly119 N	2.8
	N	Glu113 Oε2	3.4
		Gly119 O	2.9
	Sγ	Asn116 N	3.5
		Leu117 N	3.5
His118	O	His120 N	4.0
		Trp121 Nε1	3.2

5. Interação entre Subunidades e Estrutura de Solvente

As interações entre as duas subunidades permitem estabelecer três níveis de folhas β que se estendem através do dímero, dois no domínio I, folhas β_1 e β_2 , e o terceiro no domínio II, folha β_3 . A figura IIIA.9 mostra as interações entre subunidades para cada folha β com as correspondentes pontes de hidrogénio estabelecidas entre átomos da cadeia principal conforme apresentado na tabela IIIA.7.

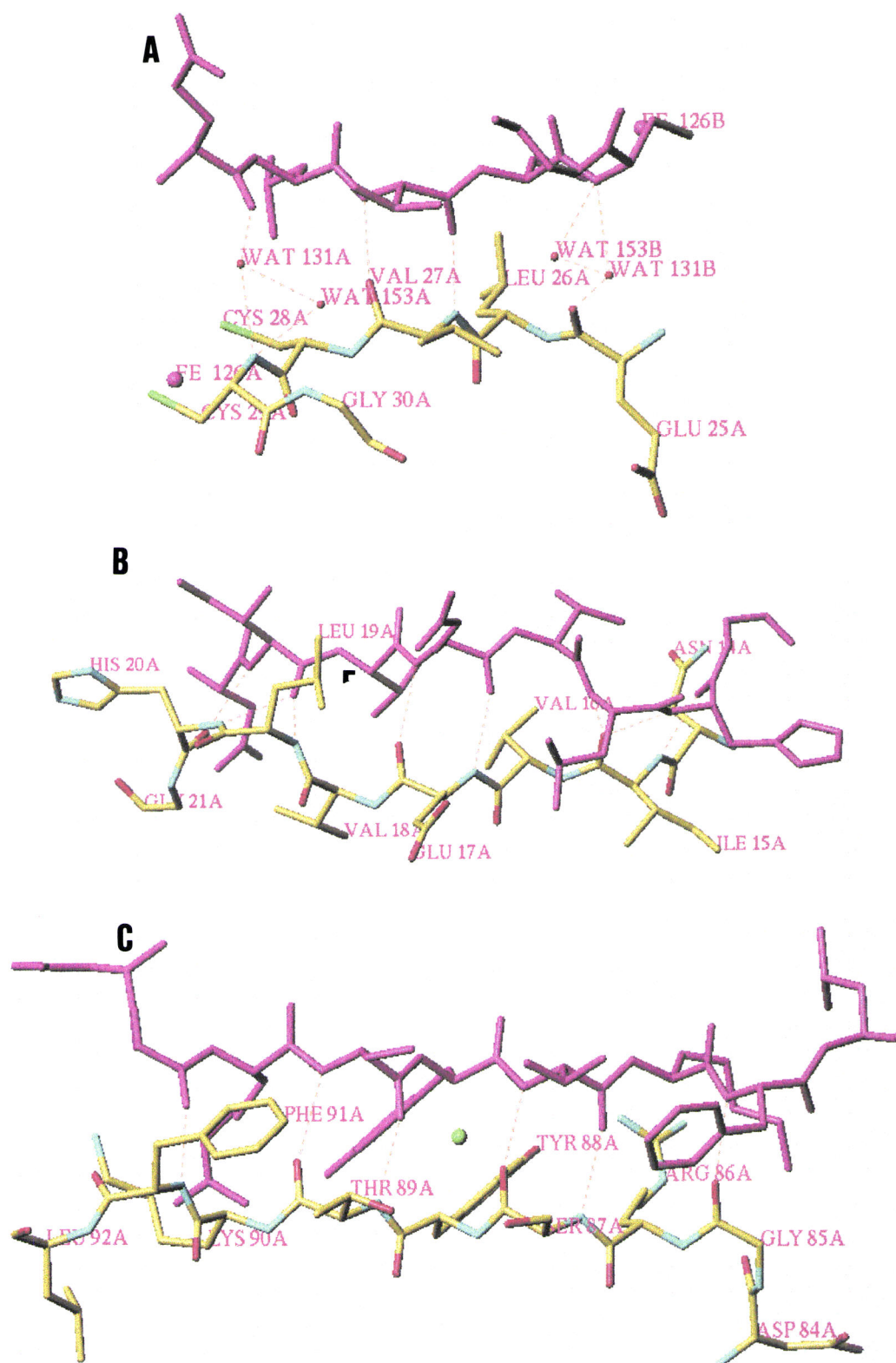


Figura III.A.9. Interações estabelecidas pelas duas subunidades ao nível das folhas A) $\beta 1$, B) $\beta 2$ e C) $\beta 3$. Para cada folha β uma das fitas está colorida de acordo com o tipo de átomo e a relacionada por simetria está representada a magenta. As interações por pontes de hidrogénio estabelecidas entre cada par de fitas β estão representadas por linhas a tracejado. Na figura A) estão representadas as moléculas de água que medeiam a interação entre subunidades e na figura C) está representado a verde o íão cálcio presente entre monómeros.

Tabela IIIA.7. Ligações por pontes de hidrogénio estabelecidas entre subunidades, A e B.

				Distância (Å)
Folha β1:				
Val27A	O	Val27B	N	2.5
	N		O	2.5
Folha β2:				
Ile15A	O	Leu19B	N	2.7
		His20B	N	3.0
	N		O	2.8
Glu17A	O	Glu17B	N	2.9
	N		O	2.9
Leu19A	N	Ile15B	O	2.7
His20A	O	Ile15B	N	2.8
	N		O	3.0
Folha β3:				
Gly85A	O	Phe91B	N	2.8
Ser87A	O	Thr89B	N	2.7
	N		O	2.9
Thr89A	O	Ser87B	N	2.9
	N		O	2.7
Phe91A	N	Gly85B	O	2.8

Na folha β 1 algumas interações do tipo NH...O, entre átomos da cadeia principal são mediadas por moléculas de água (131 e 153 e as correspondentes relacionadas por simetria), permitindo aumentar de dois para quatro o número de pontes de hidrogénio estabelecidas entre monómeros, fortalecendo assim o carácter dimérico da molécula de DFX (ver figura IIIA.9A). As interações por pontes de hidrogénio estabelecidas pelas várias moléculas de água estruturais presentes na estrutura da DFX estão listadas na tabela IIIA.8, para as moléculas presentes no domínio I apresenta-se uma comparação com as moléculas correspondentes na DX.

Tabela IIIA.8. Interações por pontes de hidrogénio estabelecidas pelas moléculas de água estruturais.

		Distância DFX (Å)	Distância equivalente DX (Å)
Região inter-subunidades:			
H ₂ O131	Cys29A N	2.9	3.5
	Glu25B O	2.7	2.7
	H ₂ O153	3.1	2.6
H ₂ O153	Cys29A N	3.3	3.7
	Gly30A N	2.6	2.6
Segunda esfera de coordenação do centro ferro I:			
H ₂ O147	Cys9 Sγ	3.4	3.1
	Glu31 O	2.8	2.9
	Pro32 O	3.1	3.5
	Met33 N	3.5	3.6
	H ₂ O160	2.6	2.7
H ₂ O160	Thr10 N	2.8	3.1
	Oγ1	3.0	-
Região interdomínios:			
H ₂ O132	Trp78 Nε1	2.7	-
	Glu80 Oε1	3.0	-
	Arg112 Ne	3.6	-
	His120 Nε2	2.9	-
	H ₂ O141	Glu17 Oε1	2.7
H ₂ O173	Glu80 Oε2	3.1	-
	Thr89 Oγ1	2.8	-
	H ₂ O173	2.7	-
	Glu17 Oε1	2.9	-
	Thr89 Oγ1	2.9	-
	H ₂ O173B	3.0	-

É interessante verificar que existe homologia para a generalidade dos resíduos envolvidos e no tipo de interações estabelecidas entre subunidades na DX e no domínio I da DFX. O mesmo se aplica às duas moléculas de água presentes na segunda esfera de coordenação do átomo de ferro I, H₂O147 e H₂O160, envolvidas num padrão de ligações por pontes de hidrogénio (ver tabela IIIA.8) que inclui, em ambas as moléculas, a Cys9, que coordena o átomo metálico. Este padrão conservado,

que pode ser observado na figura IIIA.10A, pode sugerir um papel funcional para estas moléculas de água.

Na região interdomínios existem seis moléculas de água estruturais, pertencendo três a cada monómero. Desta seis moléculas de água, uma cadeia constituída por quatro, H₂O141, H₂O173 e as equivalentes por simetria, contribui para uma rede de pontes de hidrogénio envolvendo as cadeias laterais de resíduos vizinhos (ver tabela IIIA.8). Esta rede é estendida, em ambos os lados, a mais duas moléculas de água, H₂O132 e equivalente por simetria, através dos grupos carboxílicos dos resíduos Glu80A e B. Esta organização estrutural pode ser visualizada na figura IIIA.10B.

6. Região Interdomínios e Distribuição de Resíduos Aromáticos

A cavidade presente na região interdomínios é delimitada pelos seguintes resíduos presentes em cada monómero: His3, Leu4, Val16, Glu17, Val18, Leu19, Trp78, Ile79, Glu80, Leu82, Arg86, Ser87, Tyr88, Thr89 e Arg112. Os resíduos sublinhados são conservados na DFX isolada de *D.v.* e aqueles que são também conservados na DX são apresentados em itálico. A generalidade dos resíduos com cadeias laterais polares acima mencionados estabelecem ligações com as moléculas de água constituintes da cadeia acima referida e são conservados na proteína isolada das duas espécies (ver figura IIIA.10B). As cadeias laterais de dois desses resíduos, Glu17 e Glu80, estabelecem uma ligação por ponte de hidrogénio curta entre os seus grupos carboxílicos (a distância Oε2Glu17- Oε2Glu80 é de 2.4 Å). A existência desta interação implica que pelo menos um dos dois grupos envolvidos na ligação esteja protonado.

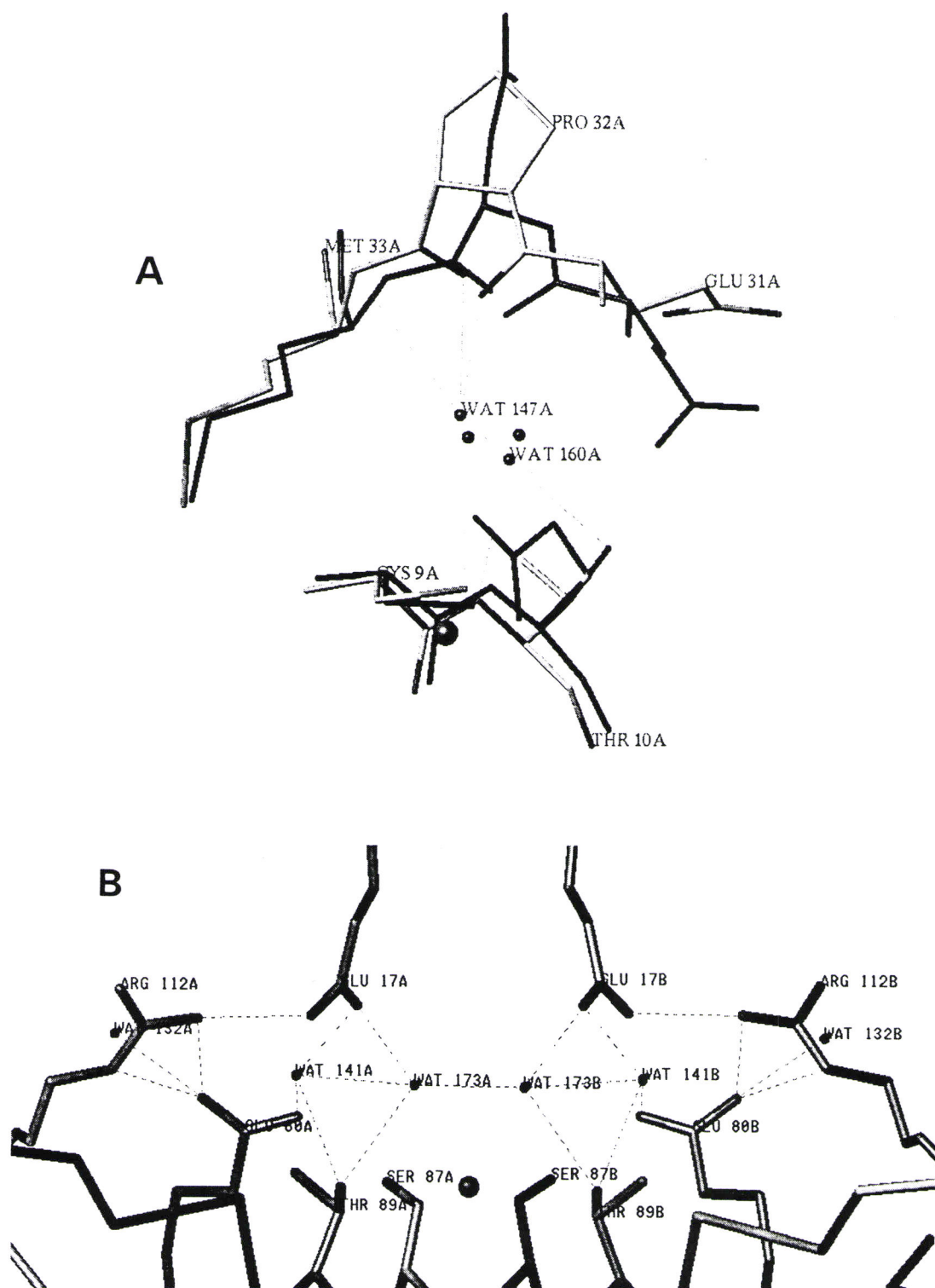


Figura III.A.10 A) Moléculas de água conservadas na proximidade do centro I na DFX e na DX (representada a negro). O átomo de ferro I está representado pela esfera de maiores dimensões. B) Zona interdomínios onde estão representadas as cadeias laterais dos resíduos polares e as moléculas de água aí incluídas. As linhas a tracejada representam as pontes de hidrogénio que podem ser estabelecidas entre os vários átomos representados. O íon cálcio está representado pela esfera de maiores dimensões. Em ambas as figuras as esferas de menores dimensões representam as moléculas de água.

Além da cadeia de moléculas de água, está também presente na região interdomínios um ião cálcio localizado sobre o eixo binário entre a fita β 3d e a equivalente relacionada por simetria. Este ião é coordenado por oito átomos de oxigénio; seis destes átomos, três de cada subunidade, são os átomos de oxigénio pertencentes aos grupos hidroxilo da Thr87 e da Ser89 e o oxigénio carbonílico da mesma serina; a coordenação é completada por duas das quatro moléculas de água constituintes da cadeia presente na região interdomínios (ver figura IIIA.10B). A densidade electrónica para esta região incluindo o ião cálcio e os seus oito ligandos é apresentada na figura IIIA.11. Os parâmetros para a sua geometria de coordenação estão listados na tabela IIIA.9. Os valores invulgarmente elevados para os comprimentos de ligação entre o ião cálcio e os seus ligandos oxigénio (os valores médios observados para moléculas pequenas variam de 2.2 a 2.8 Å) podem ser explicados pela elevada vibração térmica deste ião (valor do factor B refinado é 52.6 Å² para o ião cálcio enquanto que o valor do mesmo parâmetro para os átomos de resíduos vizinhos é de 27.2 Å²), que pode ser devida às dimensões da cavidade onde o ião está localizado conduzindo a alguma incerteza relativamente à sua posição fixa sobre o eixo binário cristalográfico (restrição imposta durante o refinamento da estrutura).

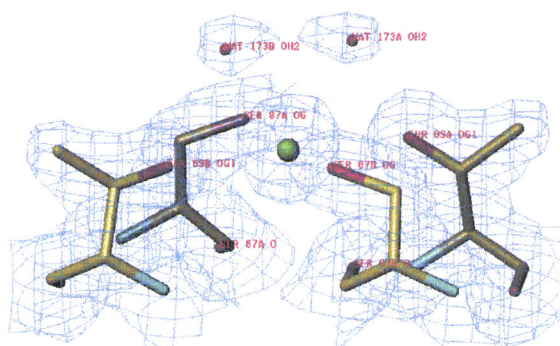


Figura IIIA.11. Ligandos do ião cálcio presente entre monómeros. O contorno da densidade electrónica $2|F_o|-|F_c|$ é feito a 1.0σ . Foi utilizada a coloração de acordo com o tipo de átomo e o ião cálcio está representado a verde.

Tabela IIIA.9. Comprimentos e ângulos de ligação envolvendo o íon cálcio.

Ligandos		Comprimento de ligação Ca-X (Å)
Ser87 O γ		3.1
Ser87 O		2.9
Thr89 O γ 1		3.1
W173		2.7
X	Y	Ângulo X-Ca-Y (°)
Ser87A O γ	Thr89A O γ 1	73
Ser87A O γ	W173A	85
Ser87A O γ	Ser87A O	62
Ser87A O γ	Thr89B O γ 1	107
Thr89A O γ 1	Ser87B O	100
Thr89A O γ 1	W173A	59
W173A	W173B	64
Ser87A O	Ser87B O	76

Uma pesquisa efectuada no Cambridge Structural Data Base revelou a existência de vários compostos de moléculas pequenas apresentando iões cálcio coordenados por átomos de oxigénio pertencentes a grupos álcool, éter, carbonilos ou carboxílicos. Por outro lado, em moléculas de proteínas são os carbonilos e os carboxilatos que mais frequentemente estabelecem ligações com iões cálcio, podendo também ser encontrados grupos álcool e moléculas de água [106]. Os números de coordenação do cálcio mais usuais em proteínas são seis ou sete, porém a existência de um maior número de ligandos é também possível [107].

Apenas um dos dois ligandos do cálcio é conservado na sequência da DFX isolada de *D.v.*, a Ser87. A Thr89 é substituída por uma lisina, o que parece sugerir que neste caso a ligação de um íon positivo nesta posição, mantendo-se a geometria da coordenação, é pouco provável. O íon cálcio pode ser importante numa eventual actividade enzimática desta proteína, mas pode ter sido apenas determinante na formação do dímero permitindo orientar os monómeros de modo a obter-se homogeneidade estrutural nas várias moléculas presentes no cristal.

Na figura IIIA.12 estão representadas a cadeia polipeptídica e as cadeias laterais para os resíduos aromáticos da DFX. Este tipo de resíduos encontra-se distribuído principalmente ao longo da região interdomínios, desde o centro II de ferro numa das subunidades ao centro simetricamente equivalente na outra subunidade. Este arranjo é interrompido na região central por um conjunto de cadeias laterais polares, já acima referido, incluindo ainda o íon cálcio e a cadeia formada por seis moléculas de água. Por baixo deste núcleo polar, pode ser observada no domínio II, na interface das duas subunidades, uma outra região com grande densidade de cadeias laterais aromáticas. Duas tirosinas, uma de cada subunidade, apresentam os seus anéis fenilo quase paralelos, a uma distância de 3.6 Å um do outro (ver figura IIIA.12).

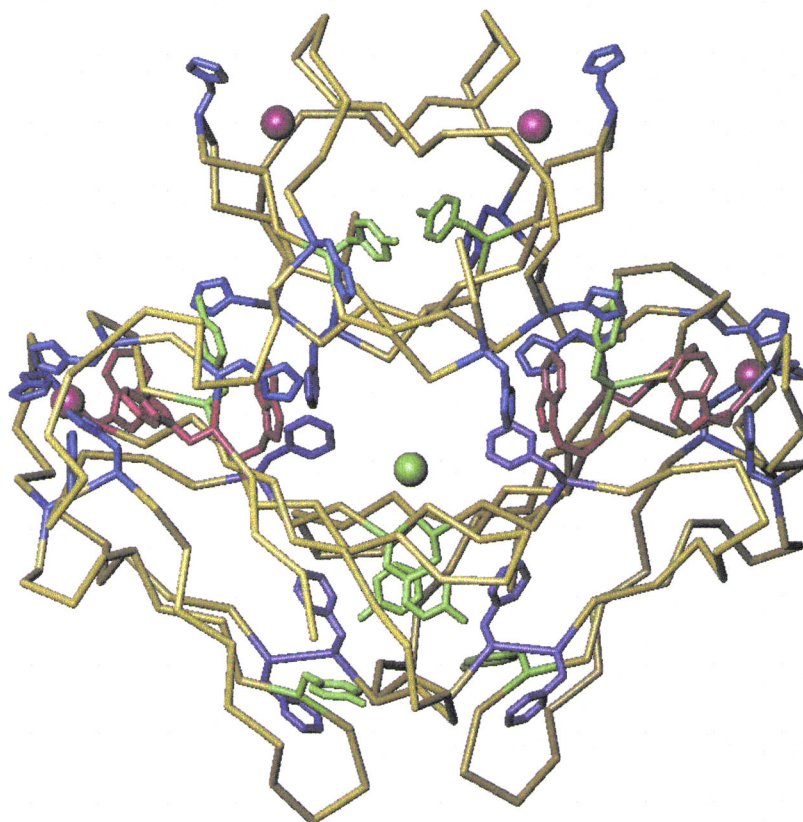


Figura IIIA.12. Representação da cadeia polipeptídica para a molécula de DFX e as cadeias laterais para os resíduos aromáticos coloridas de acordo com o tipo de resíduo: histidina a azul, triptofano a vermelho, tirosina a verde e a fenilalanina a violeta.

Este núcleo central polar ocupado nesta estrutura por quatro moléculas de água estabelece um ambiente interno invulgar que pode proporcionar um sítio de ligação para um substrato adequado. Esta distribuição de resíduos aromáticos pode representar um papel importante na transferência electrónica entre centros metálicos e entre estes e um hipotético substrato.

7. Acessibilidade relativa

A acessibilidade média ao solvente relativa para cada resíduo e átomos de ferro presentes na molécula de DFX foi calculada com o programa XPLOD, utilizando o algoritmo de Lee & Richards [108]. Foi determinada a superfície acessível dos resíduos na molécula com os átomos de hidrogénio incluídos utilizando como sonda uma molécula de água com 1.4 Å de raio, relativamente à superfície acessível dos resíduos isolados na mesma conformação em que se encontram na proteína. A acessibilidade relativa para cada resíduo está representada na figura IIIA.13.

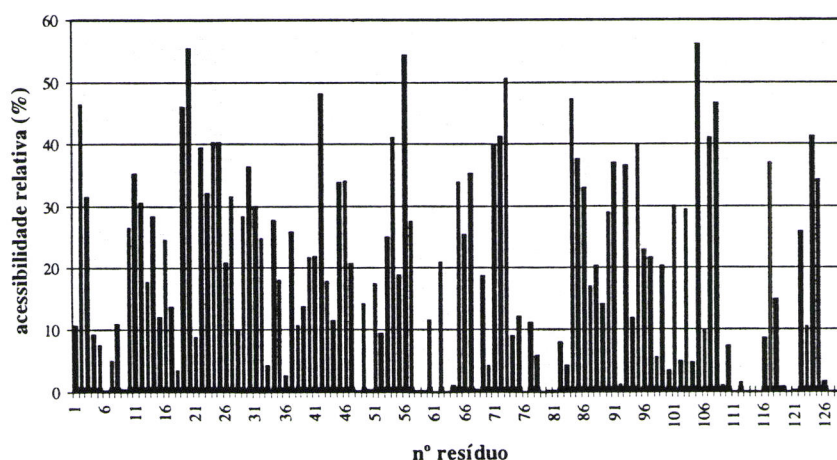


Figura IIIA.13. Acessibilidade para os vários resíduos e para os dois átomos de ferro (identificados como resíduos 126 e 127) presentes na molécula de DFX.

Os dois átomos de ferro apresentam valores de acessibilidade relativa muito baixos, sendo o valor determinado para o ferro I (1.6%) ligeiramente superior ao determinado para o átomo de ferro II (0.1%). No entanto, para os ligandos de cada um dos centros metálicos verifica-se uma diferença significativa, sendo a acessibilidade média para os ligandos no centro I (18.1%) superior à dos ligandos do centro II (4.9%). Este facto permite justificar a presença de duas moléculas de água na vizinhança do centro I. As cisteínas 12 e 29 são os ligandos dos centros de ferro que apresentam valores de acessibilidade relativa mais elevados, 30.5 e 31.6 %, respectivamente. Os resíduos His11 e Asn 14, localizados na proximidade do centro I, apresentam também uma acessibilidade relativa (35.1% e 28.2%, respectivamente) acima da média (ver figura IIIA.7C). Para o centro II, os ligandos com maior acessibilidade relativa são as histidinas 118 e 74, a que correspondem respectivamente os valores 14.7 e 9.0% (ver figura IIIA.8A).

Os valores da acessibilidade relativa para os resíduos que delimitam a cavidade presente na zona interdomínios permite sugerir quais as zonas que permitem mais fácil acesso à referida cavidade. Estes valores são apresentados na tabela IIIA.10. Dos quinze resíduos referidos nesta tabela, a Leu19 apresenta uma acessibilidade relativa mais elevada seguida da Arg86 e da His3. A Tyr88 é o outro resíduo aromático incluído neste grupo a que corresponde também uma acessibilidade relativa de valor significativo.

Tabela IIIA.10. Acessibilidade relativa média para os resíduos que delimitam a cavidade presente na região interdomínios.

Resíduo	Acessibilidade relativa média (%)
His3	31.5
Leu4	9.1
Val16	24.4
Glu17	13.6
Val18	3.5
Leu19	46.1
Trp78	5.7
Ile79	0.1
Glu80	0.2
Leu82	8.0
Arg86	33.0
Ser87	16.7
Tyr88	20.2
Thr89	14.2
Arg112	1.4

8. Empacotamento cristalino

A figura IIIA.14 mostra o empacotamento cristalino das moléculas de DFX nos cristais romboédricos, em que cada célula unitária contém 18 monómeros. É visível a existência de grandes canais de solvente na direcção paralela ao eixo *c*, direcção segundo a qual estão também orientados os eixos de rotação ternários localizados na zona central dos referidos canais de solvente. A região do centro II de ferro em cada monómero, incluindo a volta 39-47, está em contacto com os canais de solvente não interagindo com nenhuma das moléculas relacionadas por simetria, o que permite

explicar o estado desordenado desta volta. Ao longo das direcções a e b o empacotamento é mais compacto.

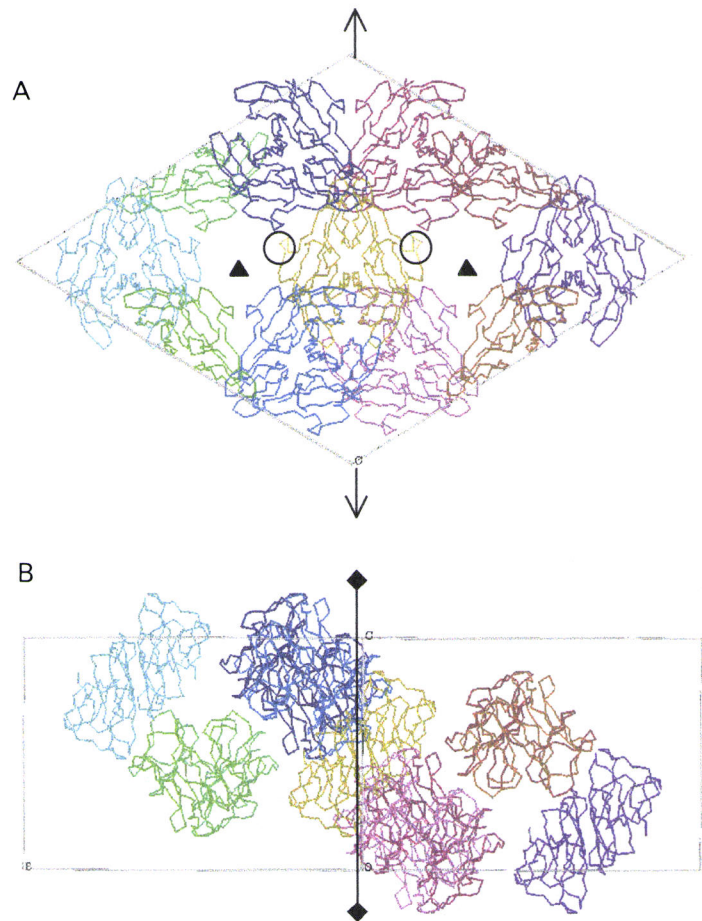


Figura III.A.14. Empacotamento cristalino das moléculas de DFX na forma cristalina romboédrica, representação do **A)** plano ab e do **B)** plano bc . Estão representados alguns dos elementos de simetria do grupo espacial $R32$, além dos eixos binários que relacionam cada dois pares de monómeros representados da mesma cor. A volta 39-47 está assinalada numa única molécula com um círculo. O eixo ternário de parafuso foi representado pelo símbolo \blacklozenge

Os dois monómeros da molécula de DFX estão relacionados por um eixo de rotação de grau 2, que para a molécula $[x, y, z]$, representada a amarelo na figura IIIA.14A, se situa na direcção vertical do plano do papel.

Eixos ternários de parafuso também orientados ao longo do eixo c estão assinalados na figura IIIA.14A acima e abaixo da molécula $[x, y, z]$ relacionando por simetria cada um dos monómeros da molécula inicial com os monómeros das moléculas a azul

e a roxo. A figura IIIA.14.B permite também visualizar o efeito da presença deste elemento de simetria no empacotamento das moléculas segundo o eixo c .

A maioria das interações por pontes de hidrogénio estabelecidas entre moléculas relacionadas por simetria correspondem à interação entre monómeros da mesma molécula, num total de 26 interações das quais 10 são mediadas por moléculas de água (ver subcapítulo IIIA.5). De salientar ainda, a interação estabelecida entre a cadeia lateral do resíduo Asp84 e a cadeia principal da Ser107 do monómero relacionado pela operação de simetria $[x-y+1/3, -y+2/3, -z+2/3]$, que pode contribuir para a distorção dos ângulos de Ramachandra já referida para este resíduo (ver subcapítulo IIA.2.2.).

Outras moléculas relacionadas por simetria próximas da molécula $[x, y, z]$, nomeadamente as relacionadas pelas operações de simetria $[-y+2/3, x-y+1/3, z+1/3]$, $[y-x+2/3, -x+1/3, z+1/3]$, $[-x+2/3, y-x+1/3, -z+1/3]$, $[y-x+1/3, -x+2/3, z+2/3]$ e $[-x+1/3, y-x+2/3, -z+2/3]$ interactivam com esta apenas por intermédio de moléculas de água.

B. Comparação entre as estruturas refinadas da desulfoferrodoxina a partir de dados de difracção obtidos para cristais romboédricos e monoclinicos

Nos seus aspecto gerais a estrutura tridimensional da DFX refinada a partir de cristais monoclinicos (DFXm), em que os dois monómeros constituintes da molécula estão relacionados por simetria não cristalográfica, é muito semelhante à estrutura obtida com cristais romboédricos (DFXr), em que as duas subunidades estão relacionadas por simetria cristalográfica, nomeadamente no que se refere à estrutura secundária e terciária do monómero, à geometria e coordenação dos centros de ferro, à posição relativa dos dois monómeros na molécula, à presença de moléculas de água estruturais e de um ião cálcio na zona interdomínios. Estes factos reflectem-se nos valores determinados para os desvios quadráticos médios (0.642 e 0.499 Å) calculados respectivamente para a sobreposição do monómero da forma romboédrica com os monómeros A e B da forma monoclinica, considerando todos os átomos. Será, por isso, apresentada uma análise comparativa das duas estruturas apenas nos aspectos julgados relevantes. Convém, no entanto, ter presente que o facto da estrutura obtida com cristais monoclinicos ter sido refinada a uma resolução inferior pode por si só justificar algumas dessas diferenças estruturais.

O diferente empacotamento das moléculas nas duas formas cristalinas pode também determinar algumas diferenças estruturais entre os dois modelos refinados. Assim, a descrição comparativa das duas estruturas é iniciada pela análise do empacotamento da forma cristalina monoclinica.

1. Empacotamento cristalino

As relações de simetria entre as várias moléculas presentes na célula unitária podem ser visualizadas na figura IIIB.1. Os canais de solvente de maiores dimensões estão orientados na direcção paralela ao eixo *c*.

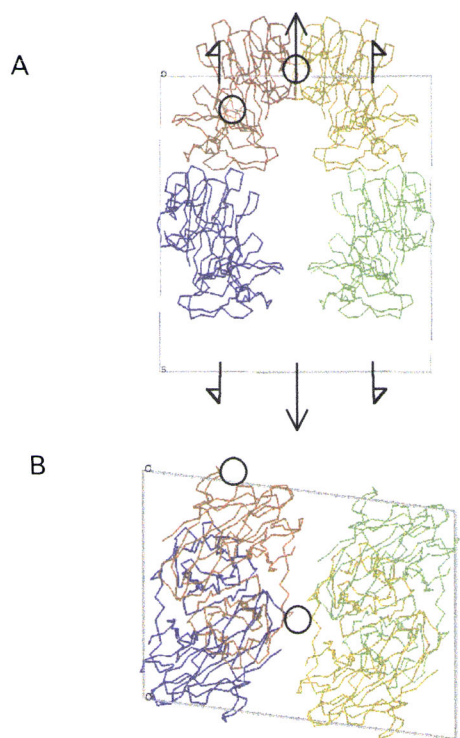


Figura III.B.1. Empacotamento cristalino das moléculas de DFX na forma cristalina monoclinica, representação do **A)** plano *ab* e do **B)** plano *ac*. Estão representados alguns dos elementos de simetria do grupo espacial *C*2. Cada molécula está representada com uma cor diferente. A volta 39-47 está assinalada numa única molécula com um círculo.

As moléculas relacionadas pelo eixo binário cristalográfico (por exemplo, na figura III.B.1A, as moléculas a amarelo e a castanho) interactuam através da volta 39-47 do monómero B em cada uma, o que implica uma melhor definição desta zona, como foi descrito na secção III.B.2.3., comparativamente ao que se observa para o monómero A e na estrutura em malha romboédrica.

A molécula $[x, y, z]$ interacciona por pontes hidrogénio com outras duas moléculas relacionadas por elementos de simetria cristalográfica, uma pelo eixo binário e a segunda pelo eixo binário de parafuso. Três destas interacções são mediadas por moléculas de água. De salientar a interacção estabelecida entre o átomo O ϵ 2 do resíduo Glu99 do monómero A da molécula $[x, y, z]$ e o átomo N δ 1 do resíduo His74 do monómero B da molécula $[-x+1/2, y+1/2, -z]$, um dos resíduos que coordenam o centro II.

2. Comparação dos aspectos gerais da estrutura refinada da desulfoferrodoxina nos dois sistemas cristalinos

As diferentes interacções efectuados pelos dois monómeros devido ao empacotamento cristalino e o facto de estarem relacionados por simetria não cristalográfica, permite ao contrário do que acontece na estrutura refinada para cristais romboédricos a ocorrência de diferenças estruturais entre os dois monómeros. Em termos médios essas diferenças não são muito significativas, o desvio quadrático médio considerando todos os átomos na sobreposição dos dois monómeros é de 0.540 Å. Porém, alguns átomos pertencentes a resíduos equivalentes nos dois monómeros apresentam desvios posicionais superiores. Além dos dois resíduos pertencentes aos terminais C e N as outras zonas com maiores diferenças posicionais, listadas na tabela III.B.1, são a

cadeia lateral da His11 na proximidade do centro I de ferro, a volta 39-46, o Asp84 envolvido na formação de uma volta em gancho de cabelo (“ β -hairpin loop”) e o oxigênio carboxílico da His118 que coordena o centro II de ferro.

Tabela IIIB.1. Átomos equivalentes dos dois monómeros que apresentam desvios posicionais superiores ao valor do desvio quadrático para a sobreposição dos dois monómeros.

Átomo e resíduo	Distância (Å)
C γ His11	0.8
C δ 2His11	1.1
N δ 1His11	1.1
C ϵ 1His11	1.4
N ϵ 1His11	1.4
O δ 1Asn14	2.3
N δ 2Asn14	2.2
OGly39	0.7
OAsp42	0.6
C β Ala44	0.6
C γ Leu45	0.6
C δ 2Leu45	0.9
C β Glu46	0.8
C γ Glu46	1.3
C δ Glu46	4.2
O ϵ 1Glu46	5.2
O ϵ 2Glu46	5.5
NAsp84	0.7
C α Asp84	1.3
C β Asp84	2.0
C γ Asp84	3.2
O ϵ 1Asp84	4.0
O ϵ 2Asp84	3.7
CAsp84	0.8
NAsp84	0.7
OHis118	0.6

3. Centros de ferro e a sua vizinhança

3.1. Centro I de ferro

O centro I de ferro de ambos os monómeros, A e B, apresenta, tal como na DX e na DFX refinada na forma romboédrica, uma coordenação tetraédrica distorcida por quatro átomos de enxofre pertencentes a quatro resíduos de cisteína. Porém, para o monómero B, verifica-se que o valor do ângulo de ligação Cys9-FeI-Cys12 é comparável ao do ângulo Cys28-FeI-Cys29, sendo ambos mais elevados que os restantes. No monómero A a situação é mais próxima do observado na estrutura da DX e da DFXr, em que o maior ângulo é o estabelecido entre os resíduos de cisteína sequenciais, Cys29-FeI-Cys28. As figuras III B.2A e B mostram a coordenação e a densidade electrónica em torno do centro I, para cada um dos monómeros. Na figura III A.2C está representada a sobreposição dos ligandos do centro I nos dois monómeros.

Na tabela III B.2 são listados alguns parâmetros geométricos para a esfera de coordenação do centro I para a DFX refinada na forma monoclinica. As distâncias ferro-enxofre determinadas para a DFXr são iguais a 2.3 Å, enquanto que para DFXm os valores variam entre 2.0 e 2.4 Å.

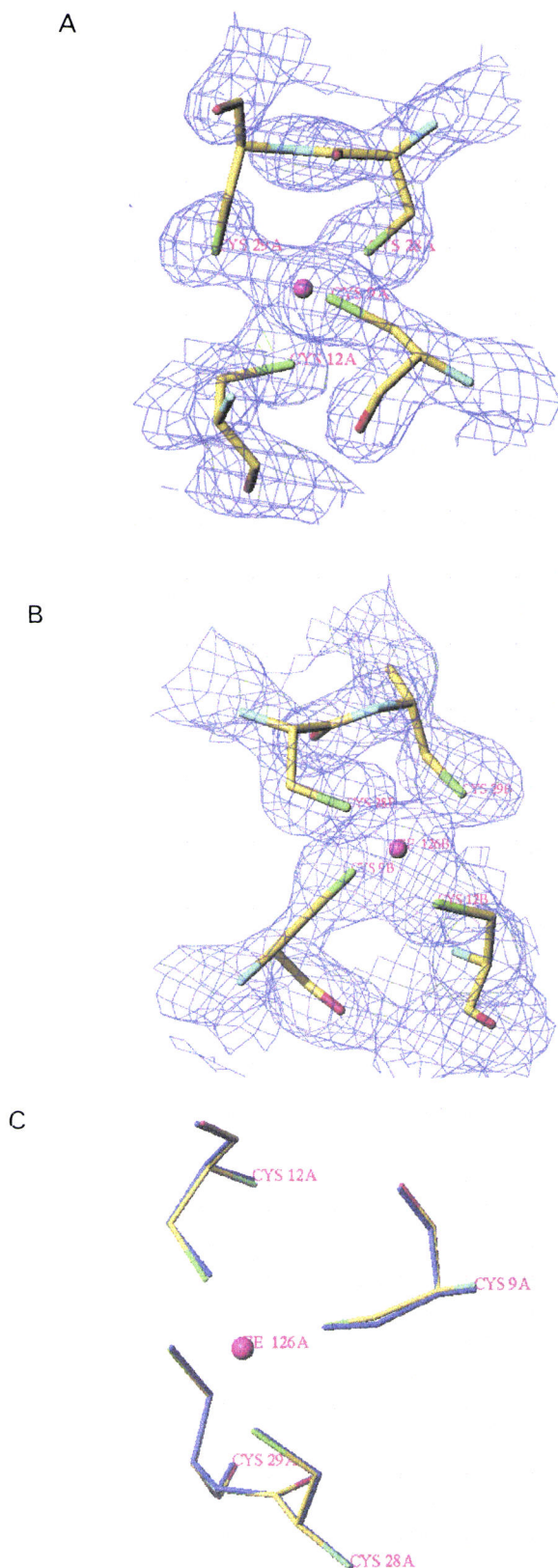


Figura III.B.2. Representação da coordenação e da densidade electrónica $2|F_o|-|F_c|$ (1.0σ) do centro I nos monómeros **A)** A e **B)** B. Na figura **C)** é apresentada a sobreposição dos quatro ligandos do centro I nos dois monómeros. As Cys9 e 12 são as que apresentam maiores desvios na estrutura dos dois monómeros.

Tabela IIIB.2. Comprimentos e ângulos de ligação em torno do centro I de ferro na DFXm.

Comp. ligação Fe-S _{cys} (Å)	Monómero A	Monómero B
9	2.0	2.1
12	2.3	2.2
28	2.2	2.4
29	2.4	2.5
Ângulos ligação S _{cys} Fe-S _{cys} (°)		
9-12	112	121
9-28	108	108
9-29	106	105
12-28	103	97
12-29	106	108
28-29	122	117

Permanecem na segunda esfera de coordenação do centro I desta estrutura os resíduos His11 e Asn14. No monómero A verifica-se um aumento da distância FeI-Nδ1 His11 para 6.2 Å, enquanto que no monómero B esta distância é de valor comparável ao observado na DFXr. Apesar da distância FeI-Asn Oδ1 se manter em ambos os monómeros idêntica à determinada para a DFXr, apenas no monómero B é estabelecida uma ponte de hidrogénio com uma das cisteínas coordenadas ao centro I, a cisteína 12. As pontes de hidrogénio estabelecidas pelos resíduos coordenados ao átomo de ferro I estão sumarizadas na tabela IIIB.3. Dos quatro ligandos apenas um em cada monómero não estabelece qualquer interacção deste tipo, nomeadamente a Cys29 e a Cys12, respectivamente no monómero A e B.

Tabela IIIB.3. Ligações por pontes de hidrogénio estabelecidas por ligandos do centro I.

Distância de interacção (Å)	Monómero A	Monómero B
Cys9 O His11 N	3.1	-
Gly13 N	2.9	2.9
N Asn14 O	2.9	2.8
Cys12 Sγ Asn14 Oδ1	3.1	-
Cys28 O Gly30 N	3.1	-
Glu31 N	3.1	-
N Glu31 O	2.9	2.8
Cys29 O Glu31 N	-	3.0

Relativamente ao observado na DFXr o número de pontes de hidrogénio estabelecidas pelos ligandos do centro I é menor na DFXm, sendo o padrão mais conservado no monómero A.

3.2. Centro II de ferro

A geometria da coordenação e a densidade electrónica em torno do átomo de ferro II podem ser visualizadas nas figuras IIIB.3A e B para cada um dos monómeros. Os valores dos parâmetros geométricos apresentados na tabela 4 são muito semelhantes entre monómeros e relativamente à DFXr.

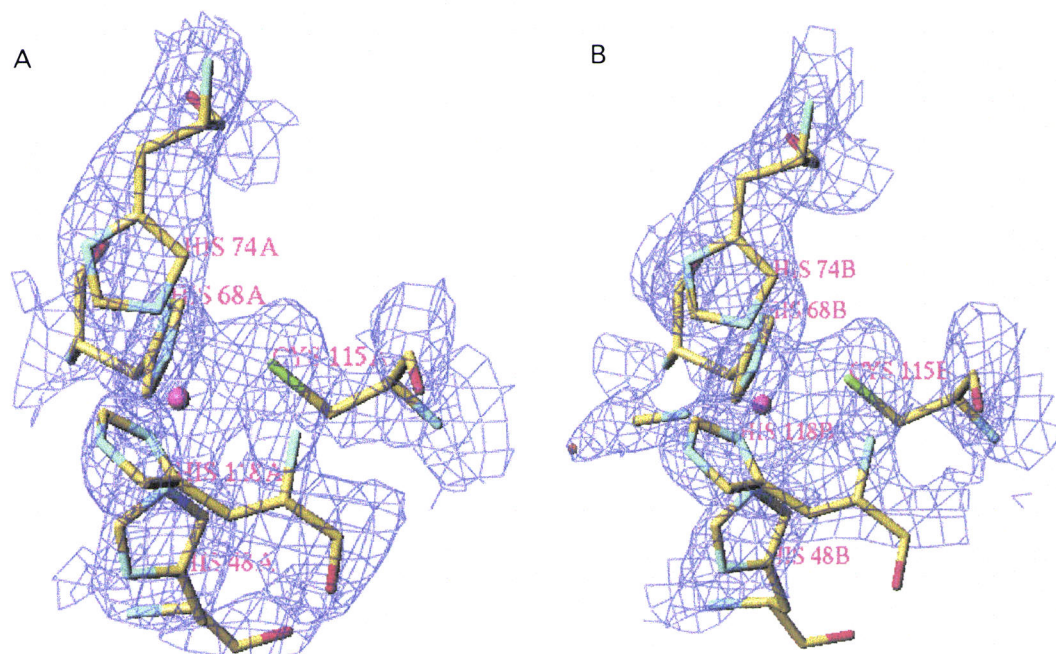


Figura III.B.3. Representação da coordenação e da densidade electrónica $2|F_o|-|F_c|$ (1.0σ) do centro II nos monómeros **A)** A e **B)** B. No monómero B é visível como ligante o átomo de azoto de um ligando cianeto do ião hexacianoferrato. Só existe densidade electrónica para um ligando cianeto e para o átomo de ferro.

Tabela IIIB.4. Parâmetros geométricos para a esfera de coordenação do átomo de ferro II nos dois monómeros, A-B.

Ligandos		Comprimento de ligação (Å) Fe-X		
His48 Nε2		2.1-2.2		
His68 Nε2		2.3-2.3		
His74 Nε2		2.1-2.1		
His118 Nδ		2.3-2.2		
Cys115 Sδ		2.2-2.2		
Ligandos		Ângulos de Ligação	Ângulos entre os planos definidos pelas cadeias laterais de histidinas em posições opostas (°)	
		X(N,S)-Fe-N(°)		
His48	His68	96-96	His48-His74	145-134
His68	His74	78-80	His68-His118	71-76
His74	His118	93-96		
His118	His48	86-82		
Cys115	His48	118-114		
Cys115	His68	96-97		
Cys115	His74	83-83		
Cys115	His118	101-103		
Plano de mínimos quadrados definido pelos átomos de azoto ligados ao ferro				
$0.3x+0.8y-0.5z= -29.6 - 0.1x+0.4y-0.9z= -30.7$				
Desvios ao plano (Å)		Ângulo entre o plano e a ligação Fe-Cys115 Sγ (°)		
His48 Nε2		0.0-0.0		
His48 Nε2		0.0-0.0		
His48 Nε2		0.0-0.0		
His118 Nδ		0.0-0.0		
Cys115 Sγ		2.5-2.5		
Fe		0.4-0.3		

A sexta posição de coordenação encontra-se vazia no monómero A, enquanto que no monómero B é parcialmente ocupada (cerca de 30%) pelo átomo de azoto de um dos ligandos cianeto do ião hexacianoferrato. Apenas foi possível localizar o átomo de ferro e o ligando cianeto que estabelece a ligação com o átomo de ferro II. Na tabela IIIB.5 são apresentados alguns parâmetros geométricos para a estrutura do ião hexacianoferrato refinado com coordenação incompleta e para a sua interação com o

átomo de ferro II. É ainda apresentada uma lista dos átomos da proteína mais próximos do ião hexacianoferrato. O mapa de densidade electrónica $|Fo|-|Fc|$ sugere a existência de conformações alternativas para um dos ligandos do centro II, His74, possivelmente devido à interacção estabelecida pelo ião hexacianoferrato com este centro.

Tabela IIIB.5. Alguns parâmetros geométricos do ião hexacianoferrato, para a sua interacção com o átomo de ferro II do monómero B e com os átomos vizinhos da estrutura de DFX.

Parâmetros geométricos para o ião hexacianoferrato			
Comprimento de ligação (Å)		Ângulo de ligação (°)	
C2-N2	1.2	Fe _{CN} -C2-N2	148
Fe _{CN} -C2	2.0		
Parâmetros geométricos para a ligação entre o ião hexacianoferrato e o centro II			
Comprimento de ligação (Å)		Ângulo de ligação (°)	
FeII-N2	2.2	FeII-N2-C2	150
		N2-FeII-Nε2 His48	89
		N2-FeII-Nε2 His68	69
		N2-FeII-Nε2 His74	75
		N2-FeII-Nδ1 His118	100
Vizinhança do ião hexacianoferrato			
Átomos ião hexacianoferrato		Átomos proteína	Distância (Å)
N2		Lys 47 Cε	2.8
N2		Lys 47 Cδ	2.8
Fe _{CN}		Lys 47 Cε	2.4

O ferro constituinte do ião hexacianoferrato foi identificado com Fe_{CN}.

A Lys47 é, tal como na DFXr, o resíduo que apresenta a sua cadeia lateral mais próxima da sexta posição de coordenação. No modelo refinado DFXm a distância

entre o átomo Lys47N ζ e o átomo de ferro é de 7.6 Å, diminuindo para cerca de 6.0 Å considerando outro rotamero possível para a cadeia lateral deste resíduo.

Os resíduos não coordenados e com a sua cadeia lateral localizada na proximidade do centro II, assim como as distâncias entre o átomo de ferro e o átomo mais próximo de cada resíduo, são listados na tabela IIIB.6. O Trp121 é, também nos dois monómeros da DFXm, o único resíduo aromático nesta situação. As ligações por pontes de hidrogénio estabelecidas pelos ligandos do centro II de ferro estão listadas na tabela IIIB.7.

Tabela IIIB.6. Distância mínima entre o átomo de ferro II e as cadeias laterais de outros resíduos presentes na proximidade do centro II de ferro, nos dois monómeros, A-B.

Distância mínima FeII-resíduo (Å)	
Pro69 C γ	6.4-6.2
Ile76 C δ 1	5.4-5.1
Asn116 O δ 1	5.6-5.7
Leu117 C β	4.8-4.7
Trp121 N ϵ 1	6.4-6.3

Tabela IIIB.7. Ligações por pontes de hidrogénio estabelecidas por ligandos do centro II, nos dois monómeros, A-B.

Distâncias (Å)			
His48 O	Pro50 N		- -3.1
N	Ala44 O		3.1-3.2
	Met45 O		3.2- -
N δ 1	Ala44 O		3.0- -
His68 N	Val63 O		2.9-3.1
His74 O	Glu71 N		- -2.6
N	Glu71 O		3.0-2.8
Cys115 O	Leu117 N		2.9-2.9
	Gly119 N		2.9-3.1
N	Glu113 O ϵ 2		3.2- -
	Gly119 O		2.9-2.9
His118 O	Trp121 N ϵ 1		2.7-3.1
N	Cys115 O		3.2- -

Os resíduos que constituem a segunda esfera de coordenação do centro II coincidem com os presentes na DFXr. No entanto, o número de interações por pontes de hidrogénio estabelecidas pelos ligandos do centro II é significativamente menor na estrutura DFXm.

4. Interação entre subunidades e estrutura de solvente

As interações entre as duas subunidades são do mesmo tipo das descritas para DFXr. As pontes de hidrogénio estabelecidas entre átomos da cadeia principal estão listada na tabela IIIB.8.

Tabela IIIB.8. Ligações por pontes de hidrogénio estabelecidas entre subunidades.

				Distância (Å)
Folha β1:				
Val27A	O	Val27B	N	2.7
	N		O	2.8
Folha β2:				
Ile15A	O	Leu19B	N	3.0
		His20B	N	3.3
	N		O	2.7
Glu17A	O	Glu17B	N	2.8
	N		O	2.8
Leu19A	N	Ile15B	O	2.8
His20A	O	Ile15B	N	2.8
	N		O	3.1
Folha β3:				
Gly85A	O	Phe91B	N	2.7
Ser87A	O	Thr89B	N	2.8
	N		O	2.9
Thr89A	O	Ser87B	N	2.9
	N		O	2.8
Phe91A	N	Gly85B	O	2.7

Apenas três moléculas de água medeiam as interações entre subunidades estabelecidas ao nível da folha β 1 (3012, 3070 e 3072), sendo três o número total de pontes de hidrogénio estabelecidas entre monómeros (ver figura IIIB.4). As interações por pontes de hidrogénio estabelecidas pelas várias moléculas de água estruturais presentes na estrutura da DFX estão listadas na tabela IIIB.9.

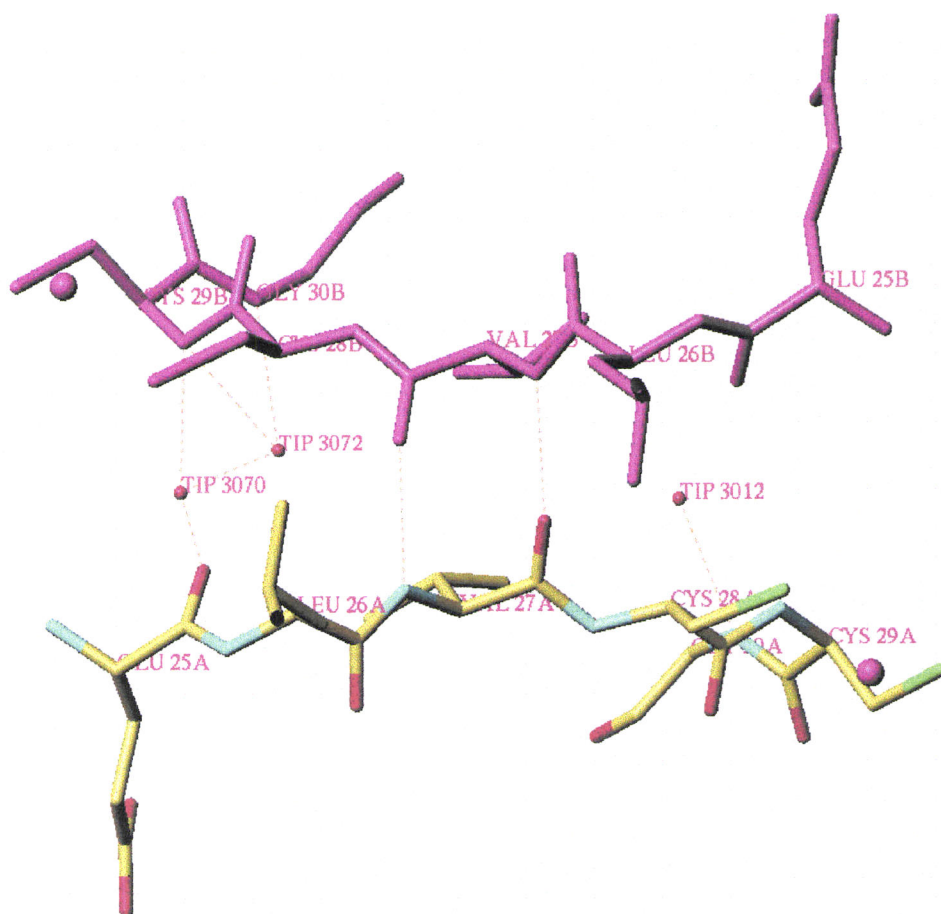


Figura III.B.4. Interações estabelecidas pelas duas subunidades ao nível da folha β 1, uma das fitas está colorida de acordo com o tipo de átomo e a relacionada por simetria está representada a magenta. As interações por pontes de hidrogénio estabelecidas entre fitas β estão representadas por linhas a tracejado. Estão também representadas as moléculas de água que medeiam a interação entre subunidades.

Tabela IIIB.9. Interações por pontes de hidrogénio estabelecidas pelas moléculas de água estruturais.

		Distância DFX (Å)
Região inter-subunidades:		
H ₂ O3070	Cys29B N	2.8
	Glu25A O	2.8
	H ₂ O3072	2.4
H ₂ O3072	Cys29B N	3.1
	Gly30B N	2.8
H ₂ O3012	Gly30A N	2.7
Segunda esfera de coordenação do centro ferro I:		
H ₂ O3022	Cys9A Sγ	3.1
	Cys28A O	2.9
	Glu31A O	3.0
	H ₂ O3005	2.5
Região interdomínios:		
H ₂ O3003	His20B Nε2	2.6
	Trp78B Nε1	2.8
	Glu80B Oε1	3.0
H ₂ O3033	Thr89B Oγ1	3.1
H ₂ O3027	Glu17A Oε1	2.8
	Ser87A Oγ	3.2
H ₂ O3065	Glu17A Oε1	3.3
	Thr89A Oγ1	2.5
H ₂ O3014	Thr89A Oγ1	3.5
	Glu80A Oε1	2.8
	Trp78A Nε1	2.6
	His20A Nε2	2.7
	Glu80A Oε1	

Apenas no monómero A foram localizadas duas moléculas de água na segunda esfera de coordenação do átomo de ferro I, cujo padrão de interações pode ser observado na figura IIIB.5.

Das seis moléculas presentes na região interdomínios na DFXr, apenas cinco foram identificadas na DFXm, a distância entre elas é superior a 4 Å o que não permite o estabelecimento de pontes de hidrogénio. Os resíduos com que interactivam são os já referidos para DFXr, à excepção do Trp78 e da Arg 112. Esta organização estrutural pode ser visualizada na figura IIIB.6.

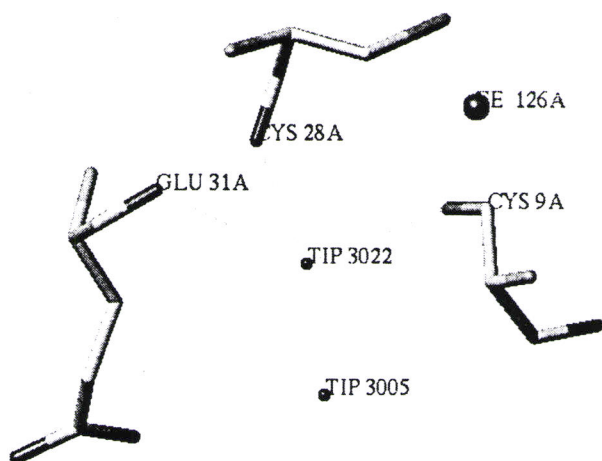


Figura III.B.5. Moléculas de água conservadas na proximidade do centro I na DFX. As moléculas de água e o átomo de ferro I estão representados por esferas, sendo a de maiores dimensões para o átomo de ferro.

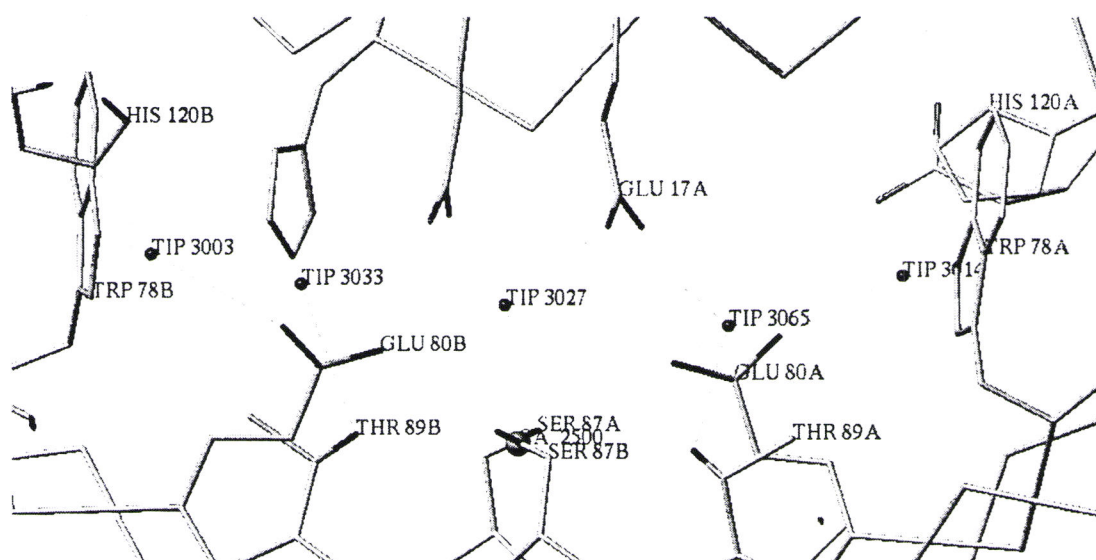


Figura III.B.6. Zona interdomínios onde estão representadas as cadeias laterais dos resíduos polares e aromáticos e as moléculas de água aí incluídas. As linhas a tracejada representam as pontes de hidrogênio estabelecidas entre os vários átomos representados. As moléculas de água e o íon cálcio estão representados por esferas, sendo a de maiores dimensões para o íon cálcio.

5. Ião cálcio presente na região interdomínios

O ião cálcio presente na região interdomínios e localizado entre os dois monómeros é na DFXm coordenado por seis átomos de oxigénio; dois do monómero A e três do monómero B. Os seus ligandos são os átomos de oxigénio pertencentes aos grupos hidroxilo da Thr87 e da Ser89 e o oxigénio carbonílico da mesma serina, a coordenação é completada por uma das cinco moléculas de água da cadeia presente na região interdomínios (ver subcapítulo IIIB.4). A densidade electrónica para esta região incluindo o ião cálcio e os seus seis ligandos é apresentada na figura IIIB.7. A diminuição do número de ligandos de oito, na DFXr, para seis, na DFXm, pode ser uma consequência do processo de refinamento das duas estruturas, devido a diferentes restrições impostas durante o mesmo e da resolução inferior usada para o refinamento da DFXm não permitir a eventual localização de todas as moléculas de água na esfera de coordenação do ião cálcio. Nomeadamente, devido à posição do ião cálcio ter sido fixada sobre o eixo binário cristalográfico que na forma romboédrica relaciona os dois monómeros, restrição não imposta durante o refinamento da forma monoclinica, onde os dois monómeros estão relacionados por simetria não cristalográfica.

A geometria de coordenação do ião cálcio é semelhante às descritas para a calmodolina [109] e para a troponina C [110], em que cinco ligandos estão dispostos num plano que estabelece um ângulo de cerca de 90° com a ligação ao sexto ligando. Na DFXm um dos cinco ligandos, o oxigénio carbonílico da Ser87A, está ligeiramente fora do plano, sendo a sexta posição de coordenação, a cerca de 90° do plano, ocupada pelo O_{γ1} da Thr89B. A figura IIIB.7 mostra esta geometria de coordenação a que correspondem os parâmetros listados na tabela IIIB.10. Tal como para DFXr, os valores dos comprimentos de ligação entre o ião cálcio e os seus

ligandos oxigénio são invulgarmente elevados. O que pode, também neste caso, ser explicado pela elevada vibração térmica deste ião (valor do factor B refinado é 41.3 \AA^2 para o ião cálcio enquanto que o valor do mesmo parâmetro para os resíduos vizinhos é de 26.9 \AA^2) e pode também ser justificada tendo em conta as elevadas dimensões da cavidade onde o ião está localizado. Considerando um factor de vibração térmica para o ião cálcio idêntica ao da média dos seus ligandos obtém-se um valor refinado da ocupação de cerca de 60%.

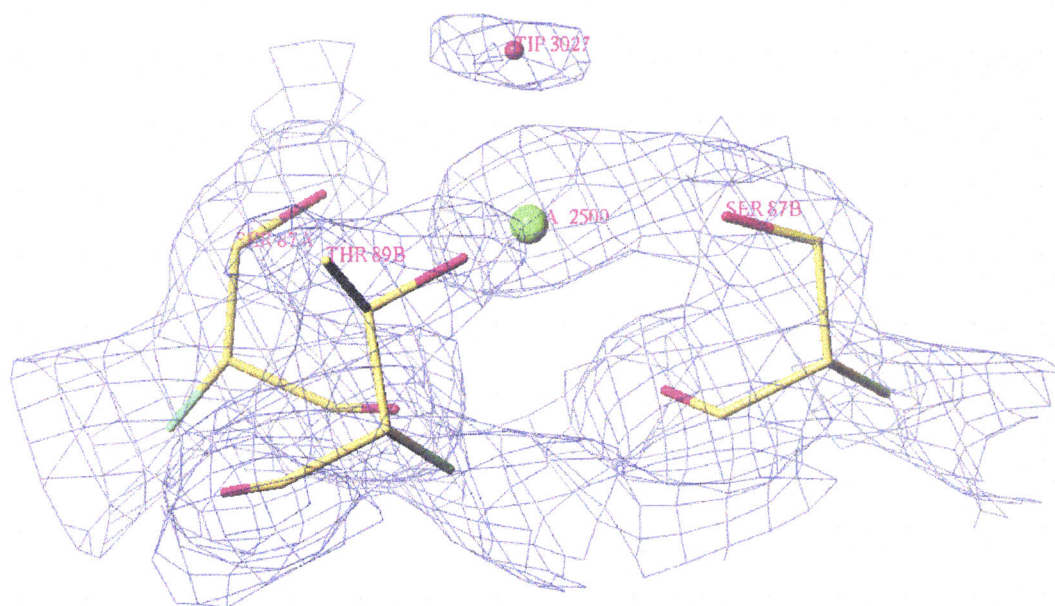


Figura III.B.7. Ligandos do ião cálcio presente entre monómeros. O contorno da densidade electrónica $2|F_o|-|F_c|$ é feito a 1.0σ . Foi utilizada a coloração de acordo com o tipo de átomo e o ião cálcio está representado a verde.

Tabela IIIB.10. Comprimentos e ângulos de ligação envolvendo o íon cálcio.

Ligandos	Comprimento de ligação Ca-X (Å)	
Ser87A O γ	2.9	
Ser87A O	2.9	
Ser87B O γ	2.8	
Ser87B O	2.9	
Thr89B O γ 1	3.1	
H ₂ O3027	2.8	
X	Y	Ângulo X-Ca-Y (°)
Ser87A O γ	H ₂ O3027	69
Ser87A O γ	Ser87A O	61
H ₂ O3027	Ser87B O γ	102
Ser87A O	Ser87B O	75
Ser87B O γ	Ser87B O	64
Thr89B O γ 1	Ser87A O	80
Thr89B O γ 1	Ser87A O γ	98
Thr89B O γ 1	Ser87B O	82
Thr89B O γ 1	H ₂ O3027	107
Thr89B O γ 1	Ser87B O	81

As propostas apresentadas para explicar a importância do íon cálcio na DFXr continuam a ser válidas no caso da estrutura monoclinica.

C. Proteínas com topologia semelhante à DFX

Como já foi referido em IIA.4 não foi encontrada homologia sequencial entre a DFX e outras proteínas além da DX e do N-terminal da neelaredoxina. No entanto, após uma pesquisa efectuada na base de dados de estruturas tridimensionais de macromoléculas biológicas Protein Data Bank, utilizando o servidor DALI do EMBL [111], verificou-se a existência de proteínas com topologia homóloga à do domínio do terminal carboxilo do monómero da DFX. Os resultados obtidos estão sumarizados na tabela III.C.1. A semelhança estrutural deve-se à presença, nestas proteínas, do motivo usualmente denominado “estrutura em folha 3+4”, característico da estrutura terciária da fibronectina III [112]. A presença deste motivo foi descrita em várias proteínas de origem animal, predominantemente em proteínas ou domínios extracelulares [113]. No entanto, a sua existência em proteínas de origem bacteriana ou vegetal limita-se, respectivamente à quitinase bacteriana [114] e ao citocromo *f* do cloroplasto [115]. Para além do citocromo *f* apenas algumas metaloproteínas com centros de cobre, nomeadamente a subunidade tipo II da hemocianina [125], a superóxido dismutase de Cu-Zn [126] e a plastocianina [127], têm semelhanças estruturais com o terminal carboxilo do monómero da DFX, no entanto, com valores de desvios quadráticos

médios superiores. Tal como o centro II de ferro da DFX, o centro metálico da plastocianina está localizado à superfície da molécula e entre duas folhas β .

Tabela IIIC.1. Semelhança de topologia entre o domínio do terminal carboxilo do monómero da DFX e outras proteínas ou domínios

Proteína	Z ^a	Desvio quadrático médio ^b	# resíduos ^c
Fragmento da fibronectina humana [112]	6.6	2.8	73
Domínio extracelular do factor de coagulação [116]	6.5	2.9	73
Domínio 4, da glicoproteína superficial da célula T [117]	6.5	3.3	71
Molécula de adesão de células vasculares humanas [118]	6.4	2.6	72
Domínio fibronectina da tesnascina [119]	6.1	2.7	70
Molécula de adesão neuronal [120]	5.9	2.7	74
Domínio N-terminal da quitinase A [114]	5.7	2.8	65
Domínio CH2, do fragmento Fc [121]	5.4	2.4	66
Domínio extracelular da hormona de crescimento humano [122]	5.3	2.5	68
Domínio 2 do CD2 humano [123]	5.2	2.2	63
Subunidade zimogénio A do factor de coagulação XIII [124]	4.8	3.4	81
Citocromo <i>f</i> reduzido [115]	4.8	2.9	74
Subunidade tipo II da hemocianina [125]	2.8	3.8	73
Superóxido dismutase de Cu-Zn [126]	2.5	3.5	68
Plastocianina [127]	2.0	3.4	62

^a parâmetro quantificador da semelhança estrutural em unidades de desvios padrão acima do esperado.

^b desvio quadrático médio posicional para os átomos de C α sobrepostos.

^c numero total de resíduos equivalentes

D. Comparação dos mapas de densidade electrónica obtidos para cristais no estado oxidado e no estado semi-reduzido

Em virtude de não ter sido possível construir um modelo para a forma semi-reduzida a partir dos mapas de diferença de Fourier, não se procedeu ao refinamento desta estrutura.

A interpretação dos mapas de diferença de Fourier (ver figuras III D.1 e 2) permite sugerir a existência de algumas diferenças estruturais na proximidade do centro II de ferro nos seus dois estados de oxidação. As zonas de densidade positiva correspondem à presença de átomos na forma oxidada que estão ausentes na forma semi-reduzida e as zonas de densidade negativa correspondem à ausência de átomos na forma oxidada que estão presentes na forma semi-reduzida.

A zona de densidade positiva mais intensa situa-se na posição do ião hexacianoferrato, o que sugere a presença deste ião apenas na forma oxidada do centro II, de acordo com a composição das soluções de cristalização utilizadas na obtenção dos cristais. No mapa de diferença de Fourier calculado utilizando dados de difracção de baixa resolução para a forma oxidada (figura III D.1A) observou-se uma zona positiva e uma zona negativa na proximidade do átomo de ferro II, sendo a primeira ligeiramente mais intensa que a segunda. O mapa calculado com os dados de difracção

de maior resolução (figura III.2A) apresenta as mesmas características, no entanto, a zona de densidade positiva está quase centrada na posição do átomo II de ferro. Estas observações sugerem uma alteração da posição do átomo de ferro na forma semi-reduzida relativamente à oxidada com uma ocupação inferior a 100% na forma semi-reduzida.

Como resultado da observação do mapa representado na figura III.1A é ainda relevante sugerir a existência de diferentes conformações para a cadeia lateral da His48 coordenada ao átomo de ferro. A existência de uma zona de densidade negativa contínua sobre a volta 41-45 no mapa representado na figura III.1B permitem sugerir uma diferença conformacional desta volta no cristal na forma semi-reduzida.

E. Alguns comentários sobre os resultados de MS e PIXE

As determinações da massa molecular da DFX efectuadas por espectrometria de massa permitem concluir que em soluções concentradas esta proteína dimeriza. Não foi encontrada uma explicação para as diferenças obtidas entre os valores determinados experimentalmente e os calculados.

A razão Fe/S determinada experimentalmente para os cristais obtidos na presença de hexacianoferrato de potássio (0.24) coincide com a presença de três átomos de ferro por monómero em que um deles esteja presente numa ocupação de cerca de 30%, como foi sugerido pela interpretação dos mapas residuais calculados utilizando o formalismo de máxima verosimilhança. O reduzido valor da mesma razão determinada experimentalmente para os cristais crescidos na presença de ascorbato de sódio (0.12), pode apenas ser explicado considerando que pelo menos um dos átomos de ferro presentes no monómero da DFX tem uma ocupação bastante inferior a 100%. Esta interpretação foi também sugerida com base nos mapas de diferença de Fourier, embora seja discutível.

A razão Ca/S determinada experimentalmente (0.06) sugere a existência de um íão cálcio por monómero de DFX nos cristais obtidos na presença de ascorbato de sódio,

o que está de acordo com a determinação estrutural efectuada utilizando dados de difracção recolhidos para cristais obtidos na presença do agente oxidante. Os mapas de diferença de Fourier determinados não sugerem a existência de diferenças estruturais nesta zona da molécula na presença dos dois agentes redox. A presença de uma quantidade superior de cálcio, como foi sugerida para a determinação efectuada para cristais crescidos na presença de hexacianoferrato de potássio, não foi observada durante o processo de refinamento da estrutura da DFX.

F. Caminhos preferenciais de transferência electrónica na desulfoferrodoxina

A actividade funcional da DFX não é ainda conhecida mas a hipótese de ser uma proteína que está envolvida em processos de transferência electrónica é plausível, embora potenciais parceiros redox não tenham sido ainda identificados. Foram efectuados cálculos com o objectivo de determinar possíveis caminhos de transferência electrónica entre os centros de ferro desta proteína e de identificar potenciais aceitadores ou dadores presentes na região interdomínios. Como já foi referido, tendo em conta as suas características estruturais, pode sugerir-se que esta região constitua um centro activo.

1. Breve descrição dos modelos teóricos actualmente utilizados em estudos de transferência electrónica

Os processos de transferência electrónica (TE) intramoleculares em proteínas ocorrem vulgarmente entre grupos prostéticos separados por distâncias superiores a 10 Å. Apesar de neste caso, os aceitadores e os dadores envolvidos nestes processos apresentarem uma fraca interacção, os processos de TE são, no entanto, bastante rápidos e prosseguem com elevada especificidade. O fraco acoplamento electrónico

entre dador e aceitador separados por grandes distâncias conduzem a velocidades de TE que são proporcionais ao factor de acoplamento electrónico determinado entre centros redox da proteína, $|T_{DA}|^2$, e a um factor originado pelo movimento nuclear associado ao processo de TE, o factor de Franck-Condon, FC, [128, 129] de acordo com a expressão, onde h é a constante de Planck

$$k_{et} = 2\pi/h |T_{DA}|^2(FC).$$

Alguns modelos simplificados consideram o meio entre dador e aceitador como uma ponte ou túnel formado por um conjunto de orbitais que podem interactuar entre si de modo diverso, descrevendo T_{DA} a interacção dador-aceitador associada com a transferência dos electrões ao longo desse túnel [130]. Considerando o mesmo par dador-aceitador, o factor FC irá manter-se constante, logo é possível verificar, nesta situação, quais as vias preferenciais para a TE.

O factor T_{DA} diminui de um factor multiplicativo ϵ à medida que a cadeia se torna mais longa. O factor ϵ depende do tipo de interacção electrónica entre as orbitais que constituem o túnel, isto é, se estabelecem ligações covalentes (C) ou pontes de hidrogénio (H) ou se ocorrem simples saltos no espaço (S). Deste modo, T_{DA} pode ser descrito pela seguinte expressão

$$T_{DA} = A \prod_i \epsilon_C(i) \prod_j \epsilon_H(j) \prod_k \epsilon_S(k)$$

onde A é um pre-factor que depende dos detalhes da interacção entre dador e aceitador com a primeira e a última ligação da via-túnel e cada factor ϵ se refere ao decaimento por cada passo de TE ao longo do túnel [131]. O processo de TE será mais eficiente e T_{DA} estará sujeito a menor decaimento quando a via prossegue através de ligações covalentes, aumentando o decaimento sucessivamente quando estão envolvidas ligações por pontes de hidrogénio e por saltos no espaço.

O objectivo do método é caracterizar os caminhos de TE que maximizam T_{DA} , assumindo estes caminhos como os mais prováveis para o processo de TE em questão.

2. Cálculos de transferência electrónica para a desulfoferrodoxina

Os cálculos descritos neste capítulo foram efectuados sobre a orientação do Doutor Cláudio Soares (ITQB).

Os cálculos do factor T_{DA} foram efectuados para a DFX utilizando o programa Greenpath [132], cujo algoritmo se baseia nos modelos mais simples de TE acima descritos. Foi utilizado o modelo para a molécula de DFX refinado a 1.9 Å ao qual foram retiradas, além do ião cálcio presente entre monómeros, as moléculas de solvente que não foram consideradas estruturais (ver subcapítulo IIIA.5), isto é, foram apenas consideradas aquelas que estão localizadas na proximidade do centro I de ferro e na zona interdomínios. De notar que, como já foi mencionado, os processos de TE dependem de FC, um factor extremamente difícil de calcular. No entanto, para grandes diferenças de T_{DA} não é esperado que existam diferenças suficientes em FC que possam tornar erróneas as interpretações baseadas em T_{DA} . No entanto, este aspecto deve ser tomado em conta quando da análise dos resultados.

Os factores de acoplamento calculados para os vários átomos expostos ao solvente, considerando como centro redox quer o centro I quer o centro II, foram utilizados na obtenção das superfícies de acoplamento representadas na figura III F.1. Áreas específicas com valores elevados para o factor de acoplamento podem representar zonas de *docking* preferenciais com possíveis parceiros redox [133]. A comparação das superfícies de acoplamento determinadas considerando os centros I e II não permite dizer que um deles é um centro redox preferencial. No entanto, as zonas com

forte acoplamento em redor dos centros metálicos quando considerados centros redox, sugerem tratar-se de prováveis sítios de *docking* para um parceiro redox.

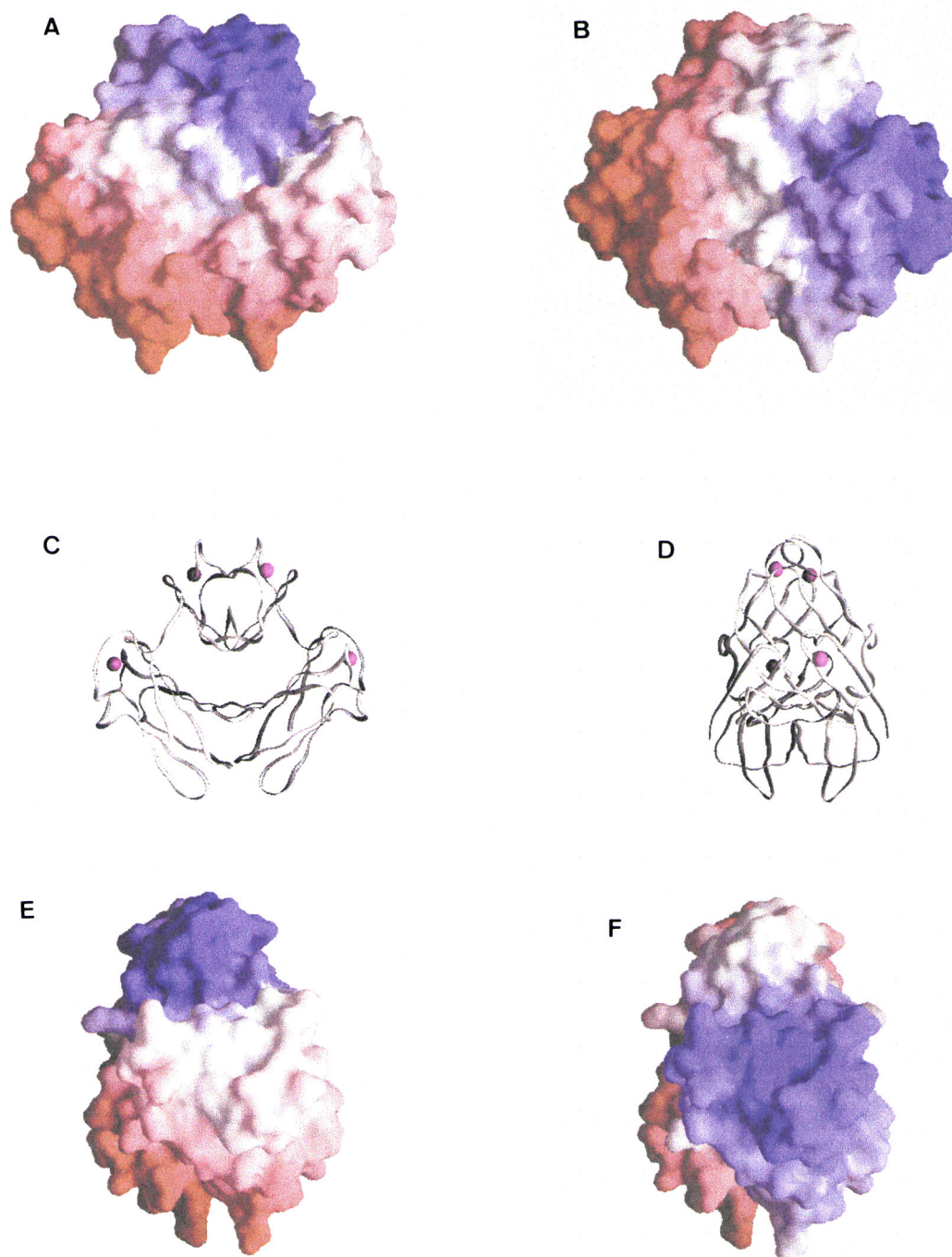


Figura III.F.1. Superfícies de acoplamento calculadas considerando como centro redox **A)** e **E)** o centro I ou **B)** e **F)** o centro II. O factor de acoplamento varia entre 0 e -30 sendo as superfícies coloridas de vermelho a azul, respectivamente, passando pelo branco. Nas figuras **A)** e **B)** o dímero está orientado com o eixo binário ao longo do plano do papel e nas figuras **E)** e **F)** está rodado de 90° em torno do mesmo eixo binário. Nas figuras **C)** e **D)** está representada a cadeia polipeptídica com as mesmas orientações, respectivamente, das figuras **A)** e **E)** e **B)** e **F)**. Os átomos de ferro estão representados a magenta.

Na tabela III.F.1 estão representados alguns parâmetros determinados para as vias de transferência electrónica preferenciais entre os vários centros de ferro presentes na molécula de DFX. A comparação dos valores dos factores de acoplamento determinados para os vários processos de TE considerados permite sugerir que: a) é pouco provável a ocorrência de TE entre centros de ferro de tipo diferente pertencentes a monómeros diferentes; b) é pouco provável a ocorrência de TE entre os centros II de ferro presentes em monómeros diferentes e; c) como já tinha sido referido em [30] para a DX, existe também na DFX um via de TE curta entre os dois centros I de ferro presentes em monómeros diferentes.

Para os pares aceitador-dador mais prováveis estão representadas na figura III.F.2 as vias de TE preferenciais.

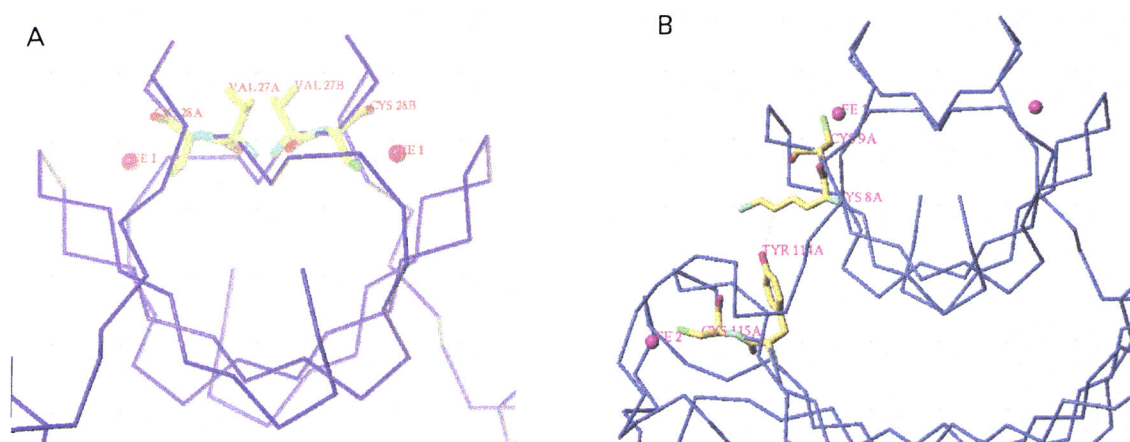


Figura III.F.2. Percurso preferencial de transferência electrónica **A)** entre os centros de ferro do domínio I e **B)** entre os centros de ferro de uma mesma subunidade. A cadeia polipeptídica está representada a azul e os resíduos envolvidos nos percursos de transferência electrónica estão coloridos de acordo com o tipo de átomo.

A análise das superfícies de acoplamento para a cavidade correspondente à zona interdomínios permite verificar que os resíduos delimitantes desta cavidade pertencentes ao domínio I têm factores de acoplamento mais elevados quando o centro I é considerado centro redox. Se o centro II for considerado centro redox são

os resíduos delimitantes pertencentes ao domínio II que apresentam factores de acoplamento mais elevados. Estes resultados são de esperar tendo em conta as distâncias entre cada um desses centros e os resíduos em causa. No entanto, alguns resíduos apresentam factores de acoplamento significativamente elevados relativamente ao valor médio do conjunto. De entre estes foram seleccionados aqueles que pelas suas características químicas poderiam à partida ser considerados como potenciais intervenientes em interacção com um possível substrato, nomeadamente o Glu17, Trp78, o Glu80 e a Asn112. Foram determinadas as vias de TE preferenciais entre o centro redox mais provável e cada um destes resíduos. Estas estão representadas na figura III.F.3, enquanto que na tabela III.F.2 estão sumarizados alguns dos parâmetros relevantes.

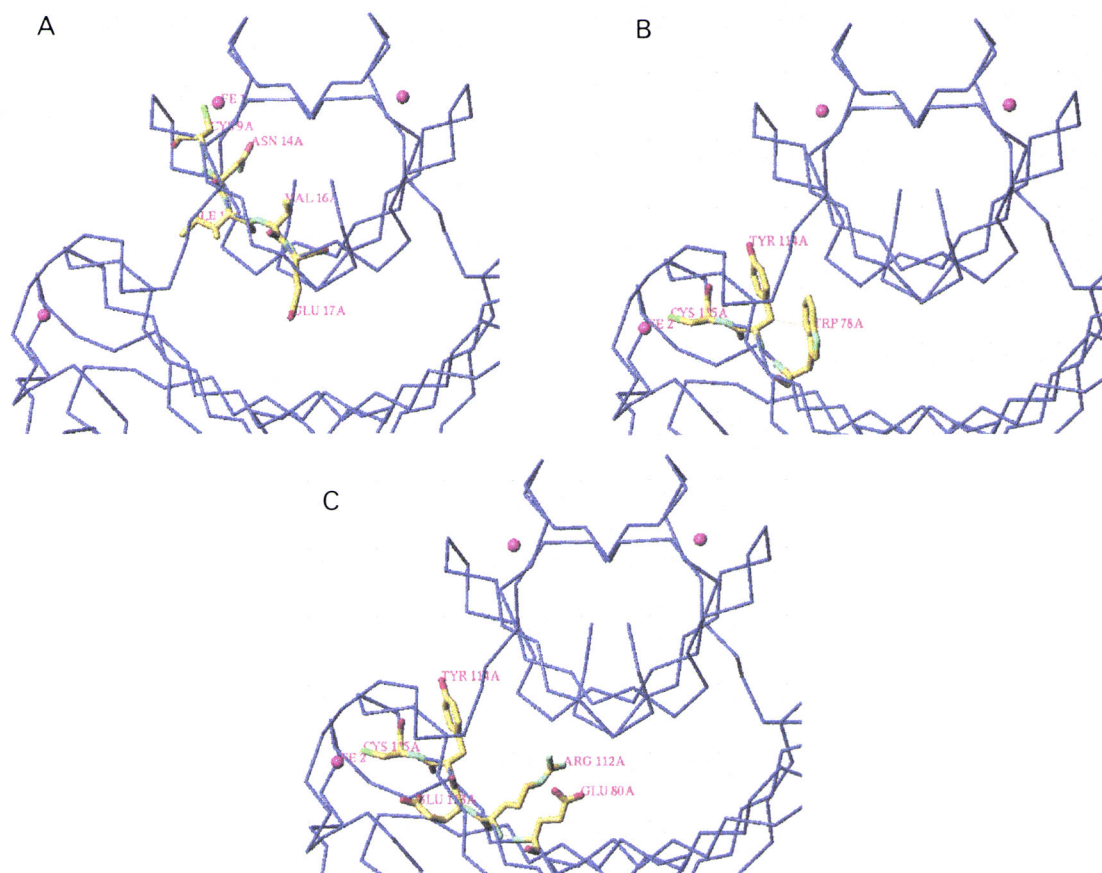


Figura III.F.3. Percurso preferencial de transferência electrónica entre um dos centros de ferro e resíduos presentes na zona interdomínios: **A)** FeI-Glu17, **B)** FeII-Trp78, **C)** FeII-Arg112, Glu80. A cadeia polipeptídica está representada a azul e os resíduos envolvidos nos percursos de transferência electrónica estão coloridos de acordo com o tipo de átomo.

Tabela III.F.1. Alguns parâmetros determinados para as vias TE entre os vários centros de ferro da molécula de DFX.

Centros de ferro envolvidos na TE	Factor de acoplamento	Nº de transferências através de ligações	Nº de transferências por saltos	Distância (Å)
FeIA-FeIB	7.57×10^{-5}	15	1	20.72
FeIA-FeIIA	2.78×10^{-7}	23	1	31.50
FeIA-FeIIB	3.51×10^{-11}	37	2	51.77
FeIIA-FeIIB	4.94×10^{-14}	46	3	63.30

Tabela III.F.2. Alguns parâmetros determinados para as vias TE envolvendo centros de ferro e resíduos limitantes da zona interdomínios.

Centros de ferro envolvidos na TE	Factor de acoplamento	Nº de transferências através de ligações	Nº de transferências por saltos	Distância (Å)
FeI-Glu17	1.39×10^{-5}	17	1	23.82
FeII-Trp78	1.96×10^{-4}	7	1	13.51
FeII-Glu80	1.44×10^{-5}	17	1	23.99
FeII-Arg112	1.02×10^{-4}	17	0	22.56

É de salientar a semelhança na ordem de grandeza dos factores de acoplamento determinados quando um dos elementos do par aceitador-dador é um dos resíduos da zona interdomínios e quando os dois elementos do par são centros de ferro. Este facto parece sugerir que pode ser considerada com probabilidade idêntica a TE entre centros de ferro e entre um centro de ferro e estes resíduos particulares localizados na zona interdomínios.

Processos de TE entre centros equivalentes da DFX não aparentam ter grande importância, pois não apresentam vantagens fisiológicas, no entanto poderão ser relevantes quando o parceiro redox for um aceitador ou dador múltiplo de electrões. Por exemplo, considerando o centro I, os electrões resultantes de um dador podem ser transferidos com grande facilidade para o centro equivalente por simetria no outro monómero.

G. Algumas características estruturais e biológicas da desulfoferrodoxina e de outras proteínas não-hémicas com centros mononucleares de ferro isoladas de bactérias redutoras de sulfato

A forte interacção entre os monómeros da DFX relacionados cristalograficamente e a semelhança estrutural entre o domínio da DFX e a estrutura da DX, sugerem que ambas as proteínas são funcionalmente activas como dímeros. Todavia o dímero DX aparenta ser mais estável que o dímero DFX, uma vez que os resultados obtidos por espectrometria de massa de *electrospray* e por cromatografia de exclusão molecular são consistentes com uma molécula dimérica para a DX [17], enquanto que nas mesmas condições experimentais foi atribuída à DFX *D.d.* uma estrutura monomérica [15, 32]. No entanto, determinações efectuadas por electroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e por cromatografia de exclusão molecular sugerem que a DFX isolada de *D.v.* é também um homodímero em solução [16]. A estrutura refinada da DFX de *D.d.* sugere que a presença de um ião cálcio parece ser importante para a estabilização do dímero no cristal. Este resultado aponta para a realização de mais estudos enzimáticos, em particular da verificação da actividade de oxidoreductase da rubredoxina dependente de piridinas, até agora não observada [21].

As sequências de aminoácidos da DFX isolada de *D.d.* e de *D.v.* apresentam 79% de identidade o que sugere uma estrutura similar para as duas proteínas. O conhecimento da estrutura da DFX de *D.d.* não permite apresentar uma explicação para a elevada diferença nos valores do potencial de redução determinados para as duas proteínas.

Actualmente são conhecidas as estruturas tridimensionais de quatro proteínas não hémicas com centros mononucleares de ferro, nomeadamente DFX, DX [31], Rb [18] e Rr [23]. É interessante verificar que todas estas proteínas com excepção da neelaredoxina possuem um centro do tipo-Rb. Como já foi anteriormente sugerido [19], esta proteína em combinação com a DX pode ter em *D. gigas* uma função biológica equivalente à da DFX em *D.d.* e *D.v.*.

A DFX e a rubreritina são as únicas proteínas com estrutura conhecida que contêm por monómero um centro do tipo-Rb e um segundo centro de ferro, no caso da DFX um centro mononuclear do tipo FeSN₄ e um oxo-diférrico no caso da rubreritina.

**IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS E
PERSPECTIVAS FUTURAS**

IV CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

As estruturas refinadas para a desulfoferrodoxina utilizando dados de difracção obtidos a partir de cristais romboédricos e monoclinicos são bastante semelhantes nos seus aspectos gerais. Em ambos os casos, a forte interacção estabelecida entre monómeros e a semelhança estrutural existente entre o domínio I e a molécula de desulforedoxina são um forte indício de que a desulfoferrodoxina é uma proteína funcionalmente activa como um dímero. Observa-se também, a formação de agregados diméricos em soluções com concentração elevada da proteína, como foi determinado por espectrometria de massa.

A presença de um ião cálcio entre monómeros foi sugerida para as estrutura refinadas da DFX em ambas as formas cristalinas, romboédrica e monoclinica, e por determinações efectuadas utilizando a técnica de PIXE. A necessidade da sua presença na solução de cristalização pode estar exclusivamente relacionada com uma optimização da orientação dos monómeros no estabelecimento do dímero, conferindo uma maior homogeneidade estrutural às moléculas constituintes do cristal. No entanto, um papel para este ião na actividade biológica da proteína não é completamente excluído, embora a não existência de homologia para os seus ligandos

nas duas estruturas primárias determinadas para DFX, seja um factor em desfavor desta hipótese. Seria interessante verificar, num estudo estrutural da DFX de *D.v.*, se a presença de cálcio na solução de cristalização desta proteína é também indispensável e se a posição desse ião é conservada nas duas estruturas.

A presença de um ião hexacianoferrato na sexta posição de coordenação do centro de ferro II é sugerida na estrutura romboédrica e no monómero B da estrutura monoclinica. Para o monómero A da estrutura monoclinica a sua presença não é sugerida durante o processo de refinamento e um valor elevado para o parâmetro de vibração térmica foi determinado para o átomo de ferro no centro II, sugerindo uma ocupação inferior a 100% para este átomo. O empacotamento cristalino pode ser responsável pelas diferenças observadas, pois conduz à existência de interacções diferentes entre as moléculas relacionadas por simetria cristalográfica nas duas formas cristalinas e a interacções diferentes entre a região do centro II entre cada um dos dois monómeros e as moléculas relacionadas por simetria cristalográfica nos cristais monoclinicos. Além dos resultados obtidos a partir do refinamento das duas estruturas, a interpretação dos mapas residuais calculados utilizando o formalismo de *likelihood*, a interpretação dos mapas de diferença de Fourier calculados utilizando dados de difracção recolhidos para cristais obtidos na presença de ferricianeto e de ascorbato e os valores determinados para a quantidade de ferro em cristais obtidos na presença de ferricianeto recorrendo a técnica de PIXE, reforçam a proposta da ocupação da sexta posição de coordenação do centro II por um ião hexacianoferrato. A sua presença mostra que esta posição de coordenação é bastante acessível ao solvente, assim como a um eventual ligando. No entanto, a coordenação incompleta determinada para o centro II de ferro pode ser um artefacto criado pela presença do ião hexacianoferrato no ensaio de cristalização, uma vez que um outro possível sexto

ligando pode ter sido removido como consequência da ligação deste ião. A comparação das estruturas refinadas com a estrutura determinada para cristais obtidos na presença de outro agente oxidante com reduzida afinidade para ligação ao centro II poderia ajudar a esclarecer esta questão.

A única diferença que foi possível detectar entre as estruturas oxidada e reduzida do centro de ferro II foi a existência na primeira de um sexto ligando, sugerido como sendo o ião ferricianeto. A impossibilidade de detecção de outras diferenças pode ser uma consequência da inexistência de 100% de cada um dos estados de oxidação em cada um dos cristais e também devido ao facto de estarem a ser utilizadas no cálculo dos mapas de diferença de Fourier as fases determinadas para a forma oxidada. A determinação de fases para cristais crescidos na presença de ascorbato e/ou a obtenção de dados de difracção para cristais crescidos na presença de um agente redutor mais forte, e mesmo a determinação da estrutura para a forma completamente reduzida constituem situações a explorar no sentido de esclarecer este aspecto.

A existência de uma cavidade na zona interdomínios que cria um ambiente interno invulgarmente polar pode constituir um potencial centro activo, o que levantaria a hipótese da desulfoferrodoxina apresentar actividade enzimática. Considerando que o dímero é a unidade com actividade fisiológica, o processo de dimerização poderia estar dependente da presença de um eventual substrato ou do aumento da concentração de proteína acima de um determinado valor. Por outro lado, a determinação de factores de acoplamento para processos de transferência electrónica entre centros de ferro do mesmo monómero e entre um dos centros de ferro e alguns resíduos presentes na zona interdomínios com valores da mesma ordem de grandeza sugere que ambos os percursos de transferência electrónica podem ser efectuados com semelhante facilidade, isto é, um substrato presente na referida cavidade e

interactuando com certos resíduos presentes nesta zona poderia constituir o segundo centro redox.

A comparação da topologia da DFX com a de outras proteínas e a comparação da coordenação dos centros de ferro com os de outras proteínas com função biológica conhecida foram aproximações utilizadas para a elucidação de possíveis actividades biológicas para a DFX. Apenas para o domínio II do monómero se encontraram topologias semelhantes, sendo comum a vários domínios ou proteínas extracelulares de origem animal com actividades biológicas não compatíveis com a origem bacteriana da desulfoferrodoxina. O domínio N-terminal da quitinase, para o qual foi sugerido um envolvimento na interacção com a estrutura filamentosa da quitina [49], é o único exemplo de uma proteína de origem bacteriana com topologia semelhante à da DFX. A hidratase de nitrilo é a proteína que apresenta um centro de ferro com coordenação mais próxima da do centro II da DFX. A actividade biológica sugerida para a rubredoxina [116] não foi verificada nem para a DX nem para a DFX [67], o que deixa em aberto a atribuição de uma actividade biológica relacionada com o centro I destas duas proteínas. O esclarecimento da função biológica da DFX implica numa primeira fase a execução de estudos de actividade enzimática para diferentes substratos em diferentes condições, nomeadamente na presença e ausência de cálcio, utilizando diferentes concentrações de proteína. Estes ensaios deverão ser efectuados também com o objectivo de verificar a actividade de superóxido dismutase proposta por ensaios genéticos [129]. A determinação da sua localização celular é também uma componente importante a determinar em estudos futuros.

V. APÊNDICE

V. Apêndice - Composição das soluções factoriais usadas em ensaios de cristalização

Agente precipitante	Tampão	Sal
MPD 30% (v/v)	Acetato-NaOH 0.1M, pH 4.5	Cloreto de cálcio 0.2 M
-	MES-NaOH 0.1 M, pH 6.5	Tartarato de sódio/potássio 1.0
Fosfato de amónio 0.4 M	-	-
Sulfato de amónio 3.0 M	Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5	-
MPD 30% (v/v)	HEPES-NaOH 0.1 M, pH 7.5	Citrato de sódio 0.2 M
PEG 4 000, 30% (m/v)	Acetato-NaOH 0.1 M, pH 4.5	Cloreto de magnésio 0.2 M
-	HEPES-NaOH 0.1 M, pH 7.5	Citrato de sódio 1.2 M
Sulfato de amónio 2.0 M	ajustado para pH 5.5	Citrato de sódio 0.2 M
PEG 400, 30% (m/v)	Citrato-NaOH 0.1 M pH 5.5	Acetato de amónio 0.2 M
Fosfato de amónio 1.5 M	Acetato-NaOH 0.1M, pH 4.5	-
Fosfato de sódio/potássio 2.0M	HEPES-NaOH 0.1 M, pH 7.5	Sulfato de amónio 0.2 M
PEG 400, 20% (m/v)	Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5	Citrato de sódio 0.2 M
PEG 4 000, 25% (m/v)	HEPES-NaOH 0.1 M, pH 7.5	Cloreto de cálcio 0.2 M
PEG 8 000, 30% (m/v)	MES-NaOH 0.1 M, pH 6.5	Cloreto de magnésio 0.1 M
PEG 4 000, 30% (m/v)	Citrato-NaOH 0.1 M pH 5.5	Sulfato de lítio 0.2 M
-	Acetato-NaOH 0.2M, pH 4.5	Sulfato de lítio 1.0 M
MPD 30% (v/v)	Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5	Fosfato de amónio 0.2 M
Fosfato de sódio/potássio 2.0M	Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5	Acetato de amónio 0.2 M
PEG 8 000, 30% (m/v)	Citrato-NaOH 0.1 M pH 5.5	Sulfato de amónio 0.1 M
MPD 30% (v/v)	MES-NaOH 0.1 M, pH 6.5	-
PEG 400, 30% (m/v)	HEPES-NaOH 0.1 M, pH 7.5	Cloreto de magnésio 0.2 M
PEG 4 000, 30% (m/v)	Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5	Sulfato de lítio 0.2 M
Tartarato de sódio e potássio 1.0	Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5	-
-	Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5	Cloreto de cálcio 0.2 M
MPD 30% (v/v)	Citrato-NaOH 0.1 M pH 5.5	Acetato de amónio 0.5 M
-	MES-NaOH 0.1 M, pH 6.5	Sulfato de lítio 2.0 M
PEG 8 000, 30% (m/v)	MES-NaOH 0.1 M, pH 6.5	Tartarato de sódio e potássio 0.2
-	HEPES-NaOH 0.1 M, pH 7.5	Tartarato de sódio e potássio 1.0
PEG 400, 30% (m/v)	Acetato-NaOH 0.1M, pH 4.5	Sulfato de amónio 0.2 M
PEG 4 000, 20% (m/v)	HEPES-NaOH 0.1 M, pH 7.5	Sulfato de amónio 0.1 M
-	MES-NaOH 0.1 M, pH 6.5	Sulfato de amónio 2.0 M
Etanol 30% (v/v)	MES-NaOH 0.1 M, pH 6.5	Cloreto de cálcio 0.2 M
Etanol 30% (v/v)	HEPES-NaOH 0.1 M, pH 7.5	Cloreto de magnésio 0.2 M
Etanol 30% (v/v)	Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5	Acetato de amónio 0.2 M
Etanol 30% (v/v)	Acetato-NaOH 0.1M, pH 4.5	Cloreto de cálcio 0.2 M
Etanol 30% (v/v)	HEPES-NaOH 0.1 M, pH 7.5	Sulfato de lítio 0.2 M
Isopropanol 30% (v/v)	HEPES-NaOH 0.1 M, pH 7.5	Cloreto de magnésio 0.2 M
MPD 30% (v/v)	Ác. Cacodílico-NaOH 0.1 M pH	-

Agente precipitante	Tampão	Sal
Formato de sódio 2.0 M	Acetato-NaOH 0.1M, pH 4.5	-
Isopropanol 40% (v/v)	Ác. Cacodílico-NaOH 0.1 M pH	Citrato de sódio 0.2 M
PEG 4 000, 20% (m/v)	HEPES-NaOH 0.1 M, pH 7.5	-
Sulfato de lítio 1.0 M	HEPES-NaOH 0.1 M, pH 7.5	-
PEG 4 000, 30% (m/v)	Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5	Sulfato de lítio 0.2 M
PEG 6 000, 30% (m/v)	Ác. Cacodílico-NaOH 0.1 M pH	Sulfato de amônio 0.2 M
Acetato de sódio 1.5 M	Acetato-NaOH 0.1M, pH 4.5	-
Fosfato de amônio 1.0 M	-	Citrato de sódio 0.1 M
Formato de sódio 4.0 M	-	-
Citrato de sódio 1.2 M	HEPES-NaOH 0.1 M, pH 7.5	-

BIBLIOGRAFIA

Bibliografia Geral sobre Cristalografia de Proteínas

- Drenth J (1994) "Principles of Protein X-ray crystallography" Springer Verlag, Nova Iorque, EUA
- McPherson A (1982) "Preparation and analysis of protein crystals" John Wiley and Sons, Nova Iorque, EUA
- Woolfson MM (1970) "An introduction to X-ray crystallography" Cambridge University Press, Londres, Inglaterra
- Stout GH, Jensen GH (1968) "X-ray structure determination: a practical guide" The Macmillan Company Collier-Macmillan Limited, Londres, Inglaterra
- Glusker JP, Trueblood KN (1985) "Crystal structure analysis: a primer" 2ª Edição, Oxford University Press, Nova Iorque, EUA
- Ladd MFC, Palmer RA (1977) "Structure determination by X-ray crystallography" Plenum Press, Nova Iorque, EUA
- Blundell TL, Johnson LN (1976) "Protein crystallography" Academic Press, Londres, Inglaterra

-
- Giacobazzo C, Monaco HL, Viterbo D, Scordari F, Gilli G, Zanotti G, Latti M (1992) "Fundamentals of crystallography" (Giacovazzo C, Ed) Oxford University Press, Oxford, Inglaterra
 - Rhodes G (1993) "Crystallography made crystal clear - a guide for users of macromolecular models" Academic Press, Londres, Inglaterra
 - Romão MJ (1996) Boletim de Biotecnologia 53:18-36

Bibliografia Referenciada na Tese

1. Hansen TA (1994) Antonie van Leeuwenhoek 66:165-185
2. Voordouw G (1995) Appl Environ Microbiol 61:2813-2819
3. Fauque G, Legall J, Barton LL (1991) In Variations in autotrophic life (Shively JM, Barton LL, eds) 271-337, Academic Press, Londres, Inglaterra
4. Rabus R, Fukui M, Wilkes H, Widdle F (1996) Appl Environ Microbiol 62:3605-3613
5. Krumholz LR, Li J, Clarkson WW, Wilber GG, Suflita JM (1997) J Ind Microbiol Biotechnol 18:161-169
6. Boopathy R (1997) Curr Microbiol 35:64-67
7. White C, Sawyer JA, Gadd GM (1997) FEMS Microbiol Rev 20:503-516
8. Morvan B, Bonnemoy F, Fonty G, Gouet P (1996) Curr Microbiol 32:129-133
9. Roediger WE, Moore J, Babidge W (1997) Dig Dis Sci 42: 1571-1579
10. Santos H, Fareleira P, Xavier AV, Chen L, Liu M-Y, LeGall J (1993) Biochem Biophys Res Commun 195:551-557
11. LeGall J, Xavier AV (1996) Anaerobe 2:1-9

-
12. Jonhson MS, Zhulin IB, Gapuzan ME, Taylor BL (1997) *J Bacteriol* 179:5598-5601
 13. Lindley P, Hadden J, Card G, McAlpine A, Bailey S, Zaitsev V, Duke E, Arendsen A, Bultink Y, Hagen W (1997) European Research Conference "Chemistry of metals in biological systems", Tomar, Portugal
 14. Romão MJ, Archer M, Moura I, Moura JJ, LeGall J, Engh R, Schneider M, Hof P, Huber R (1995) *Science* 270:1170-1176
 15. Moura I, Tavares P, Moura JJG, Ravi N, Huynh BH, Liu M-Y, LeGall J (1990) *J Mol Biol* 265:21596-21602
 16. Verhagen MFJM, Voohorst, WGB, Kolkman JA, Wolbert RBG, Hagen WR (1993) *FEBS Letters* 336: 13-18
 17. Moura I, Bruschi M, Le Gall J, Moura JJG, Xavier AV (1977) *Biochem Biophys Res Commun* 75:1037-1044
 18. Sieker LC, Stenkamp RE, LeGall J (1994) In *Methods in Enzymology* (Wyckhoff HW, Hirs CHW, Timasheff SN, eds) 243: 203-216, Academic press, Londres, Inglaterra
 19. Chen L, Sharma P, LeGall J, Mariano, AM, Teixeira M, Xavier AV (1994) *Eur J Biochem* 226: 613-618
 20. LeGall J, Prickril BC, Moura I, Xavier AV, Moura JJG, Huynh B-H (1988) *Biochemistry* 27: 1636-1642
 21. Moura I, Tavares P, Ravi N (1994) In *Methods in Enzymology* (Wyckhoff HW, Hirs CHW, Timasheff SN, eds) 243: 216-240, Academic Press, Londres, Inglaterra
 22. Pierik AJ, Wolbert RBG, Portier GL, Verhagen MFJM, Hagen WR (1993) *Eur J Biochem* 212: 237-245

-
23. deMaré F, Kurtz DM, Nordlund P (1996) *Nature Structural Biology* 3: 539-546
 24. Gomes CM, Silva G, Oliveira S, LeGall J, Liu MY, Xavier AV, Rodrigues-Pousada C, Teixeira M (1997) *J Biol Chem* 272:22502-22508
 25. Chen L, Sharma P, LeGall J, Mariano, AM, Teixeira M, Xavier AV (1994) *Eur J Biochem* 226: 613-618
 26. Lehmann Y, Meile L, Teuber M (1996) *J Bacteriol* 178:7152-7158
 27. Bonomi F, Kurtz DMJr, Cui X (1996) *J Inorg Biochem* 1:69-72
 28. Pianzaola MJ, Soubes M, Touati D (1996) *J Bacteriol* 178:6736-6742
 29. LeGall J, Payne WJ, Chen L, Liu MY, Xavier AV (1994) *Biochimie* 76:655-665
 30. Lumpio HL, Shenvi NV, Garg RP, Summers AO, Kurtz DMJr (1997) *J Bacteriol* 179:4607-4615
 31. Archer M, Huber R, Tavares P, Moura I, Moura JJG, Carrondo MA, Sieker LC, LeGall J, Romão MJ (1995) *J Mol Biol* 251: 690-702
 32. Devreese B, Tavares P, Lampreia J, Van Damme N, LeGall J, Moura JJG, Van Beeumen J, Moura I (1996) *FEBS Letters* 385:138-142
 33. Moura I, Tavares P, Ravi N (1994) In *Methods in Enzymology* (Wyckhoff HW, Hirs CHW, Timasheff SN, eds) 243: 216-240, Academic press, Londres, Inglaterra
 34. Tavares P, Ravi N, Moura JJG, LeGall J, Huang Y-H, Crouse BR, Johnson MK, Huynh BH, Moura I (1994) *J Biol Chem* 269 10504-10510
 35. Brumlik MJ, Voordouw G, (1989) *J Bacteriol* 171: 4996-5004
 36. Brumlik MJ, Leroy G, Bruschi M, Voordouw G (1990) *J Bacteriol* 172: 7289-7292
 37. Hatchikian EC, Henry YA (1977) *Biochimie* 59:153-161
 38. Hardy JA, Hamilton WA (1981) *Curr Microbiol* 6:259-262

-
39. Ermler U, Fritsch G, Buchanan SK, Michel H (1994) *Structure* 2:925-936
 40. Anderson BF, Baker HM, Norris GE, Rice DW, Baker EN (1989) *J Mol Biol* 209:
711-734
 41. Dewan JC, Mikami B, Hirose M, Sacchettini JC (1993) *Biochem* 32:11963-11968
 42. Bailey S, Evans R, Garratt RC, Gorinsky B, Hasnain S, Horsburgh C, Jhoti H,
Lindley PF, Mydin A, Sarra R, Watson J (1988) *Biochem* 27:5804-5812
 43. Minor, W, Steczko J, Bolin JT, Otwinowski Z, Axelrod B (1993) *Biochemistry*
32: 6320-6323
 44. Boyington JC, Gaffney BJ, Amzel LM (1993) *Science* 260: 1482-1486
 45. Han S, Eltis LD, Timmis KN, Muchmore SW, Bolin JT (1995) *Science* 270:976-
980
 46. Ohlendorf DH, Lipscomb JD, Weber PC (1988) *Nature* 336:403-405
 47. Roach PL, Clifton IJ, Fülöp V, Harlos K, Barton GJ, Hajdu J, Andersson I,
Schofield CJ, Baldwin JE (1995) *Nature* 375:700-704
 48. Stoddard BL, Howell PL, Ringe D, Petsko GA (1990) *Biochemistry* 29:8885-8893
 49. Wedekind JE, Frey PA, Rayment I (1995) *Biochem* 34:11049-11061
 50. Roach Pl, Clifton IJ, Hensgens CMH, Shibata N, Schofield CJ, Hajdu J, Baldwin
JE (1997) *Nature* 387:827-830
 51. Huang W, Jia J, Cummings J, Nelson M, Schneider G, Lindqvist Y (1997)
Structure 5:691-699
 52. Iwata S, Saynovits M, Link TA, Michel H (1996) *Structure* 4:567-579
 53. Meyers RA, (1995) "Molecular biology and biotechnology", Wiley-VCH, Nova
Iorque
 54. Harlos K (1992) *J Appl Crystallogr* 25:536-538

-
55. Carter Jr, CW (1992) Em Ducruix A, Giegé R (eds) "Crystallization of nucleic acids and proteins- a practical approach" Oxford University Press, Oxford, Inglaterra, pp 47-71
 56. McPherson A (1982) "Preparation and analysis of protein crystals" John Wiley and Sons, Nova Iorque, EUA, pp 125-126
 57. Coelho AV, Matias PM, Carrondo MA, Tavares P, Moura JIG, Moura I, Fülöp V, Hajdu J, Le Gall J (1996) *Protein Science* 5:1189-1191
 58. Cosier J, Glazer AM (1986) *J Appl Cryst* 19:105-107
 59. Garman EF, Schneider TR (1997) *J Appl Cryst* 30:211-237
 60. Otwinowski Z, Minor W (1996) *Methods Enzymol* (Carter CW Jr, Sweet RM, Eds.) 276 Academic Press, Londres, Inglaterra
 61. CCP4 (1994) Collaborative Computational Project, Number 4. *Acta Cryst D*50:760-763
 62. Matthews BW (1968) *J Mol Biol* 33:491-497
 63. Navaza J, Saludjian P (1996) *Methods Enzymol* (Carter CW Jr, Sweet RM, Eds.) 276 Parte A: 581-594 Academic Press, Londres, Inglaterra
 64. Hendrickson WA (1991) *Science* 254:51-58
 65. Hendrickson WA, Ogata CM (1996) *Methods Enzymol* (Carter CW Jr, Sweet RM, Eds.) 276 Parte A: 494-523 Academic Press, Londres, Inglaterra
 66. Karle J (1989) *Physics Today* :22-29
 67. Karle J (1980) *Int J Quantum Chem:Quantum Biol Symp* 7:357
 68. Ramakrishan V, Biou V (1996) *Methods Enzymol* (Carter CW Jr, Sweet RM, Eds.) 276 Parte A: 538-557 Academic Press, Londres, Inglaterra
 69. Sturock SS, Collins JF (1993) MPSRCh versão 1.3 Biocomputing Research Unit, University of Edinburgh, Inglaterra

-
70. Blow DM, Crick FHC (1959) *Acta Cryst* A12:794-802
71. Navaza J (1987) *Acta Cryst* A43:645-653
72. Rossman MG, Blow DM (1962) *Acta Cryst* 15:24-31
73. Hendrickson WA (1991) *Science* 254:51-58
74. Petsko GA (1985) *Methods Enzymol* (Wyckoff HW, Timasheff SN, Eds) 114
Academic Press, London
75. Kabsch W (1988) *J Appl Cryst* 21:67-71
76. Kabsch W (1988) *J Appl Cryst* 21:916-924
77. Schiltz M, Prangé T, Fourme R (1994) *J Appl Cryst* 27:950-960
78. Navaza J (1990) *Acta Cryst* A46:619-620
79. Sheldrick GM (1990) *Acta Cryst* A46:467-473
80. Coelho AV, Matias P, Fülöp V, Thompson A, Gonzalez A, Carrondo MA (1997) *J Biol Inorg Chemistry* 2:680-689
81. Ramakrishnan V, Finch JT, Graziano V, Lee PI, Sweet RM (1993) *Nature* 362:219-223
82. Glover ID, Denny RC, Nguti ND, McSweeney SM, Kinder SH, Thompson AW, Dodson EJ, Wilhinson AJ, Tame JRH (1995) *Acta Cryst* D51:39-47
83. Brünger AT (1992) *Nature* 355:472-475
84. Hendrickson WA, Konnert JH (1980) Em: Diamond R, Ramaseshan S, Venkatesan K (eds) "Computing in crystallography" IUCR and Indian Acad. Sci., Bangalore, India, pp 13.01-13.25
85. Hendrickson WA (1985) *Methods Enzymol* (Wyckoff HW, Hirs CHW, Timasheff SN, Eds.) 115 Parte B: 252-270 Academic Press, Londres, Inglaterra
86. Sheldrick GM, Schneider TR (1997) *Methods Enzymol* (Carter CW Jr, Sweet RM, Eds.) 277 Parte B: 319-343 Academic Press, Londres, Inglaterra

-
87. Sheldrick G (1997) em "Direct methods for solving macromolecular structures", Ettore Majorana Centre, Erice, Italia, pp 272-283
88. Powell MJD (1977) *Math Program* 12:241-254
89. Brünger AT (1992) "X-plor: Version 3.1. A system for Protein Crystallography and NMR". Yale University Press, New Haven, CT, EUA
90. Jones TA, Zou JY, Cowan SW, Kjeldgaard M (1991) *Acta Cryst* A47:110-119
91. Moews PC, Kretsinger RH (1975) *J Mol Biol* 243:201-228
92. Engh RA, Huber R (1991) *Acta Cryst* A47:392-400
93. Kleywegt GJ, Jones TA (1994) Em: Bailey S, Hubbard R, Waller D (eds) "From the first map to the final model." SERC Daresbury Laboratory, Warrington, Inglaterra, pp 59-66
94. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM (1993) *J Appl Cryst* 26:283-291
95. Roussel A, Cambillau C (1989) Em: Silicon Graphics (eds) *Silicon Graphics Geometry Partner Directory*, Silicon Graphics, Mountain View, Califórnia, pp77-78.
96. de la Fortelle E, Bricogne G (1996) *Methods Enzymol* (Carter CW Jr, Sweet RM, Eds.) 276 Parte A: 472-494 Academic Press, Londres, Inglaterra
97. Ramachandran GN, Sassiexharan V (1968) *Adv Prot Chem* 28:283-437
98. Sibanda BL, Blundell TL, Thornton JM (1989) *J Mol Biol* 206:759-777
99. Morris AL, MacArthur MW, Hutchinson EG, Thornton JM (1992) *Proteins* 12:345-364
100. Cruickshank, DWJ (1960) *Acta Cryst* 13:774-777

-
101. Cruickshank, DWJ (1996) Em: Dodson E, Moore M, Ralph A, Bailey S (eds) "Refinement of macromolecular structures" SERC Daresbury Laboratory, Warrington, Inglaterra, pp 11-22
 102. Murshudov G N, Dodson E (1996) CCP4 Newsletter on protein crystallography 33:31-39
 103. Kleywegt GJ, Jones TA (1994) Acta Cryst D50:178-185
 104. Creighton TE (1984) "Proteins: structures and molecular properties" 2º Edição W. H. Freeman and Company, EUA
 105. Schwabe JWR, Klug A (1994) Nature Struct Biol 1:345-349
 106. Declercq J-P, Tinant B, Parello J, Etienne G, Huber R (1988) J Mol Biol 202:349-353
 107. da Silva JJRF, Williams RJP (1991) "The biological Chemistry of the elements-the inorganic chemistry of live", Clarendon Press, Oxford, Inglaterra
 108. Lee B, Richards FM (1971) J Mol Biol 55:379-400
 109. Baby YS, Bugg CE, Cook WJ (1988) J Mol Biol 204:191-204
 110. Satyshur KA, Rao ST, Pyzalka D, Drendel W, Greaser M, Sundaralingam M (1988) J Biol Chem 263:1628
 111. Holm L, Sander C. (1993) J Mol Biol 233:123-138
 112. Hurley TD, Bosron WF, Hamilton JA, Amzel LM (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:8149-8153
 113. South TL, Summers MF (1993) Prot Sci 2:3
 114. Perrakis A, Tews I, Dauter Z, Oppenheim AB, Chet I, Wilson KS, Vorgias CE (1994) Structure 2:1169-1180
 115. Martinez SE, Huang D, Szczepaniak A, Cramer WA, Smith JL (1994) Structure 2:95-105

-
116. Muller YA, Ultsch MH, Kelley RF, Vos AM (1994) *Biochem* 33:10864-10870
 117. Brady RL, Dodson EJ, Dodson GG, Lange G, Davis SJ, Williams AF, Barclay AN (1993) *Science* 260:979-983
 118. Jones EY, Harlos K, Bottomley MJ, Robinson RC, Driscoll PC, Edwards RM, Clements JM, Dudgeon TJ, Stuart DI (1995) *Nature* 373:539-544
 119. Leahy DJ, Hendrickson WA, Aukhil I, Erickson HP (1992) *Science* 258:987-991
 120. Huber AH, Wang YE, Bieber AJ, Bjorkman PJ (1994) *Neuron* 12:717
 121. Deisenhofer J (1981) *Biochem* 20:2361-2370
 122. Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA ((1992) *Science* 255:306-312
 123. Bodian DL, Jones EY, Harlos K, Stuart DI, Davis SJ (1994) *Structure* 2:755-766
 124. Yee VC, Pedersen LC, Trong I, Bishop PD, Stenkamp RE, Teller DC (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7296-7300
 125. Hazes B, Magnus KA, Bonaventura C, Bonaventura S, Dauter Z, Kalk KH, Hol WGI (1993) *Prot Sci* 2:597
 126. Djinovic Carugo K, Coda A, Battistoni A, Larri MT, Polticelli F, Desideri A, Rotilio G, Wilson KS, Bolognesi M a ser publicado
 127. Guss JM, Bartunik HD, Freeman HL (1992) *Acta Cryst* 48B:790
 128. Marcus RA, Sutin N (1985) *Biochem Biophys Acta* 811:265
 129. Moser CC, Dutton PL (1996) In *Protein electron transfer* (Bendall DS, ed) Capítulo 1: 1-21, Bios Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra
 130. Beratan DN, Onuchic JN, Winkler JR, Gray HB (1992) *Science* 258:1740-1741

-
131. Beratan DN, Onuchic JN (1996) In Protein electron transfer (Bendall DS, ed)
Capítulo 1: 23-42, Bios Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra
132. Regan JJ (1994) Greenpath versão 2, Greenpath Productions
133. Nocek JM, Zhou JS, Forest SD, Priyadarshy S, Beratan DN, Onuchic JN,
Hoffman BM (1996) Chem Rev 96:2459-2489

